

EXHIBIT A

H 0 0 0 0 0 0



Mod. C.E. - 1-4-7

PCT/EP+ 98/07721

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

EP 98/07721



REC'D	15 MAR 1999
WIPO	PCT

S
INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. RM97A000743

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati*

*risultano dall'accluso processo verbale di deposito ed inoltre: verbale di
scioglimento della riserva protocollo n. RMRO091 del 30.01.1998 della descrizione
con disegni (pagg. 71); istanza per la presda in cura protocollo n. 803640 del
15.10.1998 depositata presso l'UIBM (pagg. 3); verbale UPICA di Milano n.
MI-E 000907 per la cessione a favore dell'Istituto Superiore di Sanità con sede in
Roma (pagg. 8); istanza di correzione e integrazione protocollo n. 803745 del
20.10.1998 (pagg. 131); istanza di correzione formale protocollo n. 803901 del
30.11.1998 (pag. 3).*

28 DIC. 1998

REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE
D.ssa Paola Di CANTO

Paola Di Canto

1354PTIT

PCT/EP+ 98/07721

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

COMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione: **Ensoli Barbara** N.G. PE
 Residenza: **Via Festo Avieno, 176 - 00136 ROMA** codice: **NSLBBR60A63E472K**
 2) Denominazione: _____
 Residenza: _____ codice: _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIB

Cognome nome: **Maria Vittoria Primiceri ed altri** cod. titolare
 Denominazione studio di appartenenza: **NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.**
 Via: **Savoia** **82** **ROMA** **00198** **RM**

C. DOMICILIO ELETTIVO (semplice)

D. TITOLO

Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

DE ISTANZA DATA: _____

E. INVENTORI DESIGNATI

Cognome nome: **Barbara Ensoli** cognome nome
 1) _____ 3) _____
 2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	data di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato	data	scoglimento riserve	N° Protocollo
1) Nessuna							
2) _____							

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N° es. **24** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) **1** **XXV** a tav. **9** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
 Doc. 3) **1** **XXV** lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
 Doc. 4) **0** **XXV** designazione inventore
 Doc. 5) **0** **XXV** documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) **0** **XXV** autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) **0** **XXV** nominativo completo del richiedente

SCOGLIAMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

I. ATTESTATO DI VERSAMENTO TOTALE TARIFFA

Cinquecentosessantacinquemila

obbligatorio

COMPILATO IL **01/12/1997**FIRMA DELL(I) RICHIEDENTE **Dr. ssa Maria Vittoria Primiceri**CONTINUA SI/NO **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**UFFICIO PROVINCIALE IND COMM ART DI **ROMA****RM 97 A 000743**codice **58**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

L'anno millesimo: **nocantasette**il giorno **uno**del mese di **Dicembre**il/i richiedente/i sopraindicato/i ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto con **00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopra riportato

J. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

TIT

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

4. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

Ensoli Barbara

DATA DI DEPOSITO 01 12 1997

DATA DI RILASCIO

PROSPETTO A

5. TITOLO

Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate.

Classe proposta (sez. cl. scb)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, anti-HIV, anti-AIDS e contro i tumori e le sindromi associate all'infezione da HIV che utilizzi proteine, peptidi e DNA {wild-type o mutati} del Tat di HIV, da solo od associato a proteine, peptidi e DNA di altri prodotti virali (Nef, Rev, Gag) o di citochine ad effetto potenziante la risposta immune antivirale. L'invenzione prevede anche la immunizzazione tramite cellule dendritiche autogene, l'immunizzazione mucosale o l'immunizzazione ex vivo di cellule del sangue periferico espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti CD28.



M. DISEGNO



1354PTIT

DESCRIZIONE

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

è correto di una domanda di brevetto per l'invenzione industriale dal titolo:

"Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate"

A nome di: Barbara Ensoli
Inventori: Barbara Ensoli

RM 97 A 000743

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, anti-HIV, anti-AIDS e contro i tumori e le sindromi associate all'infezione da HIV che utilizzi proteine, peptidi e DNA (wild-type o mutati) del Tat di HIV, da solo od associato a proteine, peptidi e DNA di altri prodotti virali (Nef, Rev, Gag) o di citochine ad effetto potenziante la risposta immune antivirale. L'invenzione prevede anche la immunizzazione tramite cellule dendritiche autologhe, l'immunizzazione mucosale o l'immunizzazione ex vivo di cellule del sangue periferico espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

Stato dell'arte

L'AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) è causata dal virus HIV e caratterizzata da immunodeficienza, insorgenza di tumori soprattutto il sarcoma di Kaposi (KS) e linfomi a cellule B, infezioni opportunistiche ed alterazioni del sistema nervoso centrale. Poiché l'AIDS è diffusa in tutto il mondo ed ha un'elevata mortalità, uno degli obiettivi più importanti di sanità pubblica è lo sviluppo di un vaccino anti-HIV profilattico e/o terapeutico. A tale scopo è stato principalmente utilizzato come immunogeno l'envelope virale o sue subunità, ma i risultati sono stati insoddisfacenti per l'estrema variabilità dell'envelope virale [Wain-Hobson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3:878 (1993); Myers et al., Human Retroviruses and AIDS, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NH, 1995]. Pertanto si ritiene che, in alternativa all'immunità sterilizzante, possa essere sufficiente ottenere il blocco della progressione dell'infezione (vaccino terapeutico). Inoltre, risposte immuni protettive possono essere ottenute utilizzando come immunogeni regioni di DNA dell'agente patogeno [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Boyer et al., Nature Med. 3:526 (1997)]. In considerazione dei dati sperimentali pubblicati, l'inventore ritiene necessario utilizzare un vaccino allestito con prodotti virali diversi da env che siano più conservati tra i vari isolati di HIV in grado di indurre un'efficace risposta immune sia umorale che cellulare, e che abbiano una funzione vitale per il virus.

Questi debbono essere sperimentati nel modello dei primati non umani in quanto il sistema immune è più simile a quello dell'uomo di quello di animali filogeneticamente più distanti e nei quali si sviluppa AIDS dopo infezione. La proteina regolatrice Tat di HIV-1 possiede tutti questi requisiti: è conservata, immunogenica ed essenziale per le fasi precoci dell'infezione virale. Inoltre Tat svolge un ruolo fondamentale non solo nella replicazione virale e nella trasmissione e progressione dell'infezione, ma anche come fattore di insorgenza e di progressione dei tumori associati all'AIDS, quali il KS che è il tumore più frequente associato all'AIDS, e di altre sindromi e sintomi che insorgono dopo l'infezione da HIV.

Tat è una proteina di 86-102 aminoacidi, a seconda dei ceppi virali, codificata da due esoni. Tat è prodotta precocemente dopo l'infezione, si localizza nel nucleo e transattiva l'espressione dei geni virali interagendo con la sequenza bersaglio "Tar-responsive element" (TAR) dell'LTR [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Tat potrebbe anche avere un ruolo nella virulenza di HIV tramite altri meccanismi di azione nel ciclo virale [Huang et al., EMBO J. 13:2886 (1994); Neuvert et al., J. Virol. 70:5572 (1996); Harrich et al., EMBO J. 16:6 (1997); Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8116 (1997)]. Il prodotto del primo esone (aminoacidi 1-72) è conservato in diversi isolati virali [Myers et al., Human retroviruses and AIDS, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, (1995)] ed è sufficiente per la transattivazione di HIV-1 [Chang et al., J.

Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Esso contiene 4 domini. Il dominio acidico (aminoacidi 1-21) è importante per l'interazione di Tat con proteine cellulari; la regione ricca in cisteine (aminoacidi 22-37) rappresenta il dominio di transattivazione. Questa regione è la più conservata negli isolati primari [Meyerhans et al., Cell 58:901 (1989)]. La sostituzione della cisteina 22 con una glicina abolisce la capacità di Tat di transattivare l'HIV-LTR [Yang et al., J. Virol. 70:4576 (1996)]; la regione core (aminoacidi 38-48) è anch'essa conservata ed importante per l'attivazione, e la sostituzione della lisina 41 con una treonina inattiva l'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV [Kashanchi et al., J. Virol. 70:5503 (1996)]; il dominio basico (aminoacidi 49-57), ricco in arginine e lisine, è necessario per la localizzazione nucleare e lega specificamente il suo RNA bersaglio (TAR) [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Inoltre, la regione basica è responsabile del legame del Tat extracellulare all'eparina e agli eparan solfati proteoglicani (HSPG) [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Mutazioni nella regione basica aboliscono queste interazioni. La porzione carbossi-terminale di Tat non è necessaria per la transattivazione dell'LTR, ma contiene una sequenza arginina-glicina-acido aspartico (RGD), normalmente presente nelle proteine della matrice extracellulare (ECM), responsabile del legame di Tat ai recettori integrinici $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ e degli effetti di Tat sui tumori associati all'AIDS e sul sistema immune, vascolare e nervoso [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 149:3727 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Zauli et al., Blood 80:3036 (1996); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2: 189 (1995)]. Durante l'infezione acuta delle cellule T con HIV-1 o dopo transfezione del gene tat in cellule COS-1, la proteina Tat è rilasciata in assenza di morte cellulare nell'ambiente extracellulare [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Il rilascio di Tat dalle cellule infettate avviene anche in vivo poiché Tat è presente nel siero di soggetti infetti [Westendorp et al., Nature 375:497 (1995)] e nelle lesioni AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Dopo il rilascio, una parte della proteina rimane in forma solubile mentre l'altra si lega agli HSPG della ECM. Tat legato agli HSPG può essere recuperato in una forma solubile dall'eparina. Il legame con l'eparina è dovuto alla regione basica di Tat, previene gli effetti del Tat extracellulare e protegge la proteina dall'ossidazione tanto da averci consentito la purificazione di Tat con alta attività biologica [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Tat extracellulare può essere internalizzato dalle cellule, può migrare nel nucleo e transattivare l'espressione del genoma virale [Frankel et al., Cell 55:1189 (1988); Mann et al., EMBO J. 10:1733 (1991); Marcuzzi et al., J. Virol. 66:4228 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. L'internalizzazione di Tat avviene per endocitosi mediata dal legame dell'RGD all' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7941 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)] e/o tramite endocitosi mediata dalla regione basica che si lega agli HSPG.

Tat può attivare la replicazione virale e la diffusione dell'infezione anche tramite meccanismi indiretti che coinvolgono la modulazione dell'espressione di geni cellulari, che hanno un ruolo chiave nel controllo della sopravvivenza cellulare, e di citochine infiammatorie con effetto sulla replicazione virale [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Oltre ad essere essenziale per la replicazione del virus, Tat svolge un ruolo molto importante nella patogenesi dell'AIDS. Tat è in grado di modulare la sopravvivenza e proliferazione di cellule infettate e non infettate determinando l'attivazione o repressione di citochine, quali IL-2 [Puri et al., AIDS Res. 11:31 (1995); Westendorp et al., J. Virol. 68:4177 (1994); Chirmule et al., J. Virol. 69:492 (1995)], o di geni che svolgono un ruolo chiave nel ciclo cellulare [Sharma et al., Biochem. Biophys. Res. Co. 208:704 (1995); Zauli et al., Blood 86:3823 (1995); Li et al., Science 268:229 (1995); Westendorp et al., Nature 375:497 (1995); Gibellini et al., Blood 89:1654 (1997)]. Gli effetti anti- o pro-apoptotici di Tat dipendono da diversi fattori quali il tipo cellulare, dal fatto che Tat sia espresso dalla cellula o aggiunto alla cellula, e dalla sua concentrazione [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Zauli et al., J. Immunol. 157:2216 (1996)].

Tat è il fattore responsabile dell'aumentata frequenza ed aggressività del KS in soggetti infettati da HIV-1 [Ensoli et al., AIDS Updates, Eds. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Lippincott J.B., Philadelphia: 7: 1 (1994); Corallini et al., Cancer Res. 53: 1 (1993)]. Il KS è un tumore di origine vascolare e la neoplasia più frequente in soggetti infettati dal virus. Tat induce le cellule KS e le cellule endoteliali attivate da citochine infiammatorie (IC) a migrare, esprimere collagenasi IV, invadere la ECM e proliferare, processi necessari per l'angiogenesi e l'invasione tumorale. [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Albini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4838

(1995); Fiorelli et al., J. Clin. Invest. 95:1723 (1995)]. Questi effetti del Tat sono indotti dalle IC₁, poiché esse stimolano l'espressione dei recettori per Tat, l' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7941 (1993)]. Tat mima l'effetto delle proteine della ECM, quali la fibronectina e la vitronectina e la regione contenente la sequenza RGD e la regione basica sono necessarie per gli effetti del Tat extracellulare sulle cellule KS, sull'angiogenesi e sulla progressione del KS. La dimostrazione della presenza di Tat extracellulare e del suo legame in vivo ai recettori per il Tat nelle lesioni AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 345: 84, 1994] sostiene l'idea che Tat sia coinvolto nell'insorgenza e nel mantenimento del KS associato all'AIDS. Inoltre topi transgenici per il gene tat sviluppano tumori tipo KS o di altro fenotipo a seconda del livello di espressione del transgene [Vogel et al., Nature 335: 601 (1988); Corallini et al., Cancer Res. 53: 5569 (1993)].

E' stato suggerito che Tat svolga anche un ruolo nei fenomeni iperproliferativi e nella patogenesi dei linfomi B frequentemente osservati in individui sieropositivi ed in topi-transgenici per tat [Vellutini et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:21 (1995)], tramite meccanismi che coinvolgono l'aumento dell'espressione di bcl-2 e di citochine [Puri et al., Cancer Res. 52:3787 (1992)]. Altre evidenze confermano un possibile ruolo di Tat nell'oncogenesi [Kim et al., Oncogene 7: 1525 (1992)].

Tat può anche attivare l'espressione di promotori virali quali quelli degli herpesvirus ed altri virus che si riattivano in soggetti con AIDS favorendo l'insorgenza e la progressione di infezioni opportunistiche [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Infine, sembra anche esercitare effetti neurotossici sia diretti, tramite la regione basica e l'RGD, che indiretti tramite l'induzione di citochine infiammatorie ad effetto tossico sui neuroni del sistema nervoso centrale o sulla barriera ematoencefalica [(Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. In soggetti adulti ed in soggetti pediatrici le alterazioni del sistema nervoso centrale possono portare a demenza e ad alterazioni dell'apprendimento e del comportamento, rispettivamente.

Per quanto riguarda la risposta immune al Tat, diversi studi suggeriscono che gli anticorpi anti-Tat hanno un ruolo protettivo e possono controllare l'evoluzione della malattia in vivo [Reiss et al., J. Med Virol. 30:163 (1990); Rodman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7719 (1993); Rodman et al., J. Exp. Med. 175:1247 (1992); Re et al., J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 10:408 (1996)]. Inoltre, in vitro, anticorpi anti-Tat, non solo sopprimono l'internalizzazione, l'attivazione trans-cellulare di Tat e l'infezione [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Re et al., J. Acq. Immun. Def. Synd. 10:408 (1995)], ma inibiscono anche la proliferazione, la migrazione indotta da Tat di cellule AIDS-KS e la formazione di lesioni simil-KS indotte da nel topo [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Infine, i nostri risultati preliminari indicano che anticorpi anti-Tat sono assenti in soggetti con AIDS-KS suggerendo che questi individui non possiedono attività anticorpali bloccanti il Tat extracellulare e, pertanto, questa proteina possa agire indisturbata.

Lo sviluppo di una risposta cellulo-mediata anti-Tat nella fase iniziale dell'infezione è importante nel controllo dell'infezione [Voss et al., Virology 208:770 (1995); Rinaldo et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:481 (1995); Harrer et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 12:585 (1996)] ed esiste una correlazione inversa tra la presenza di CTL specifiche anti-Tat e la progressione della malattia [van Baal et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997)]. Simili risultati sono stati ottenuti da studi condotti su macachi inoculati con SIVmac [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)]. Inoltre recenti studi in topi di varia specie in cui il Tat è stato inoculato sia sotto forma di plasmide che di proteina hanno indicato che è possibile indurre una risposta sia umorale che cellulare verso la proteina [Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)] benché si sia osservata variabilità da specie a specie di topo e questi risultati non siano stati riprodotti con gli stessi immunogeni in uno studio sui primati non umani [Quesada-Rolander et al., ABS 6-S1, 2nd European Conference on Experimental AIDS Research, Stockholm, Sweden, May 31-June 3 (1997)]. La mancanza di riproducibilità della sperimentazione vaccinale nel topo rispetto a quella dei primati non umani è frequente e probabilmente dovuta al sistema immune che è differente nelle due specie animali e che può dar luogo a risposte immuni differenti con lo stesso immunogeno, come evidenziato per l'HIV con la proteina Env del virus. Ciò richiede che gli immunogeni candidati per le sperimentazioni vaccinali per l'uomo siano saggiati nei primati non umani e non solo in specie inferiori.

L'inventore ritiene che altre proteine virali, o loro parti, possano essere associate al Tat e potenziare una risposta immunitaria specifica contro l'HIV, ed essere di beneficio anche per la vaccinazione contro l'insorgenza di tumori e di altre patologie o sintomi associati all'infezione di HIV. Questi prodotti sono le proteine Nef, Rev e Gag di HIV.

Il Nef è un'altra proteina regolatrice virale importante per lo sviluppo della malattia [(Allan et al., *Science* 230:813 (1985); Franchini et al., *Virology* 155:593 (1986); Guy et al., *Nature* 330:266 (1987)] prodotta precocemente dopo l'infezione e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Nel sistema SIVmac/macaco la presenza di Nef correla con alte dosi di carica virale e con la progressione verso l'AIDS [(Kestler et al., *Science* 248:1109 (1991)]. Il Nef è più variabile del Tat [(Myers et al., *Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics*. Los Alamos, NH (1995)]. Nef è una proteina immunogenica [(Gobert et al., *Virology* 176:458 (1990); Choppin et al., *J. Immunol.* 147:569 (1991); Culman et al., *J. Immunol.* 146:1560 (1991); Tahtinen et al., *Virology* 187:156 (1992)], ed è capace di indurre CTL [(Bourgault et al., *J. Virol.* 66:75 (1992); Couillin et al., *J. Exp. Med.* 180:1129 (1994)]. In particolare è stata evidenziata una regione immunodominante nella regione centrale di Nef (regione 73-144) che è riconosciuta dalla maggior parte dei pazienti con CTL anti-Nef.

Rev è una proteina regolatrice virale prodotta precocemente durante l'infezione [Gait et al., *Trends Biochem. Sci.* 18:255 (1993); Parslow, *Human Retroviruses*, Ed. B.R. Cullen, IRL press, Oxford, England, p. 101 (1993)] e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Rev è essenziale per la replicazione di HIV e la progressione della malattia, ed è codificata da due esoni, parzialmente sovrapposti a quelli codificanti per Tat. Rev è una proteina nucleare [Felber et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1495 (1989)] necessaria per l'espressione degli RNA messaggeri virali per le proteine tardive [Malim et al., *Nature* 338:254 (1989)]. Rev è una proteina altamente conservata fra i diversi isolati virali di HIV-1 [Meyers et al., *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM p.1 (1993)] ed è immunogenica. Induce, infatti, la produzione di anticorpi specifici diretti contro i due domini funzionali della proteina [Pilkington et al., *Mol. Immunol.* 33:439 (1996)] durante l'infezione naturale nell'uomo [Reiss et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 5:621 (1989)] e dopo inoculazione nel topo [Hinkula et al., *J. Virol.* 71:5528 (1997)]. La diminuzione dei livelli sierici degli anticorpi anti-Rev sembra correlare con la progressione verso l'AIDS [Reiss et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 5:621 (1989)]. Rev è in grado di indurre CTL sia nell'uomo che nella scimmia [van Baalen et al., *J. Gen. Virol.* 78:1913 (1997); Venet et al., *J. Immunol.* 148:2899 (1992)] ed è stato riportato che una risposta CTL specifica anti-Rev, precocemente durante l'infezione, correla inversamente con la progressione della malattia [van Baalen et al., *J. Gen. Virol.* 78:1913 (1997); Venet et al., *J. Immunol.* 148:2899 (1992)].

Un'altro bersaglio virale è rappresentato dal gene gag che è espresso tardivamente durante l'infezione e codifica per un gruppo di proteine strutturali del capsido altamente immunogeniche [Bruisten et al., *J. Infect. Dis.* 166:620 (1992); Sipsas et al., *J. Clin. Invest.* 99:752 (1997)]. I titoli anticorpali anti-Gag rimangono elevati e stabili nella fase asintomatica dell'infezione, mentre diminuiscono a livelli molto bassi quando l'infezione progredisce ad AIDS conclamato, in concomitanza con il calo dei linfociti CD4+ e il ritrovamento del virus nel sangue [Baur et al., *J. Infect. Dis.* 165:419 (1992); Koup et al., *J. Virol.* 68:4650 (1994)]. Le proteine del Gag inducono attività CTL precocemente durante l'infezione, sia nell'uomo che nei primati [Meñariand et al., *J. Inf. Dis.* 170:766 (1994); Yasutomi et al., *J. Virol.* 70:678 (1996)], e la loro presenza correla significativamente con il controllo della viremia iniziale e della progressione della malattia [Klein et al., *J. Exp. Med.* 181:1365 (1995); Aryoshi et al., *AIDS* 9:555 (1995); Rinaldo et al., *J. Virol.*, 69:5838 (1995); Yang et al., *J. Virol.* 70:5799 (1996); Lubaki et al., *J. Infect. Dis.* 175:1360 (1997)]. Infine, le proteine p17 e p24 contengono epitopi immunodominanti che sono conservati tra diversi isolati di HIV-1 e HIV-2 e riconosciuti da CTL [Littau et al., *J. Virol.* 65:40 (1991); Buseyne et al., *J. Virol.* 67:694 (1993); Nietfield et al., *J. Immunol.* 154:2189 (1995); van Baalen et al., *J. Gen. Virol.*, 77:1659 (1996); Nixon et al., *Nature* 336:484 (1988)].

L'inventore ritiene che citochine, o loro parti, quali l'IL-12 e l'IL-15, o altre citochine ad azione immunomodulante o comunque potenziante l'effetto immunogenico di Tat possano essere utilizzate come adiuvanti nella vaccinazione anti-Tat. L'IL-12 è una potente citochina immunoregolatrice prodotta dalle cellule presentanti l'antigene quali cellule B e dendritiche [Per review vedi Trinchieri, *Curr. Opin. Hematol.*

4:59 (1997)]. L'IL-12 è prodotta precocemente dopo l'infezione da HIV ed ha azione proinfiammatoria inducendo le cellule NK e i linfociti T a produrre IFN che determina l'attivazione dei fagociti e favorisce l'induzione di linfociti Th1. L'IL-12 svolge un ruolo fondamentale nell'aumentare la resistenza nei confronti di molte infezioni causate da batteri, funghi, virus ed ha un'elevata attività antitumorale. Si pensa che i meccanismi che inducono un'immunodepressione, quali l'HIV e il virus del morbillo, agiscano anche attraverso meccanismi che sopprimono la produzione di IL-12. [Grosjean et al, J. Exp. Med. 186: 801 (1997); F. Vivier et al, J. Exp. Med. 186: 813 (1997) Schnorr et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5326 (1997)].

L'IL-15 è una citochina pleiotropica espressa dai tessuti non linfoidi, dai monociti/macrofagi attivati e dalle cellule dendritiche [Quinn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:6 (1997); Jonuleit et al., J. Immunol. 158:2610 (1997)]. L'IL-15 svolge un ruolo importante nella regolazione dell'attività NK, della proliferazione dei linfociti T e dell'attività CTL [Jullien et al., J. Immunol. 158:800 (1997); Carson et al., J. Clin. Invest. 99:937 (1997)]. L'IL-15 induce l'espansione dei CTL contro antigeni di HIV, in assenza di IL-2 e linfociti T CD4+ funzionali [Kanai et al., J. Immunol. 157:3681 (1996); Agostini et al., Blood 90:1115 (1997)]. Inoltre, l'IL-15 come l'IL-2, induce la comparsa di linfociti dotati di attività citotossica ("lymphokine-activated killer", LAK) e stimola la produzione di IFN γ nei PBMC di pazienti sieropositivi [Lucey et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:43 (1997)]. L'IL-15 attiva i monociti a produrre chemochine, svolgendo un ruolo di regolazione nell'innescare i processi infiammatori [Badolato et al., Blood 90:2804 (1997)].

Nell'ambito dei diversi sistemi volti alla generazione di vaccini efficaci antivirali ed antitumorali, l'inventore ritiene che l'utilizzazione di cellule dendritiche possa essere un elemento chiave nell'induzione della risposta immune al Tat. Ciò è dovuto al fatto che queste sono le cellule più efficienti nel presentare l'antigene e le uniche in grado di stimolare linfociti vergini, in assenza di adiuvanti [Steinman R.M., Exp. Hematol. 24: 859 (1996)]. L'uso di cellule dendritiche sostituisce la funzione di numerosi adiuvanti che consiste nell'indurre una risposta immunitaria non specifica (immunità naturale) che a sua volta in presenza dell'antigene genera una potente risposta specifica primaria.

Poiché la trasmissione dell'infezione da HIV avviene prevalentemente a livello mucosale (genitale e rettale nell'adulto, orale nel neonato), l'inventore ritiene che l'induzione di immunità protettiva a livello mucosale è un obiettivo di primaria importanza. Numerosi studi hanno recentemente dimostrato la possibilità di indurre immunizzazione mucosale locale e sistemica. In particolare la via nasale e quella orale si sono dimostrate fra le più efficienti nell'indurre una efficace risposta immunitaria mucosale anche in siti distanti, quali le mucose genitali [Rosenthal et al., Seminars in Immunology 9:303 (1997); O'Hagan et al., Novel Delivery Systems for Oral Vaccines. Eds. O'Hagan, D.T. CRC Press Boca Raton, FL, p. 176 (1994)].

Studi recenti hanno dimostrato che la costimolazione di linfociti CD4+ con biglie paramagnetiche ricoperte con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 determina l'espansione logaritmica e policlonale dei linfociti provenienti da soggetti infetti con HIV [Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)] senza attivare la replicazione e la propagazione del virus. Questa attività antivirale è conseguente alla modulazione negativa dell'espressione di CCR5, il corecettore per i ceppi monocitotropi dell'HIV-1 [Carroi et al., Science. 276: 273-276. (1997)] e in misura minore agli elevati livelli di chemochine indotti mediante costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 [Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)]. L'inventore ritiene che la possibilità di espandere linfociti autologhi da soggetti infettati con HIV in assenza di replicazione/propagazione virale consente di approntare un'efficace immunizzazione ex vivo, descritto negli esempi che può essere di grande utilità nell'allestimento di un vaccino anti-Tat.

L'inventore ritiene che queste osservazioni suggeriscono che l'immunizzazione con Tat da solo o combinato con altri prodotti virali o citochine immunomodulanti, o loro parti, potrebbe bloccare la replicazione virale in soggetti esposti dopo la vaccinazione e in soggetti già infetti, mantenendo l'infezione in uno stadio abortivo che, pertanto, potrebbe essere controllata più facilmente dal sistema immune. Pertanto l'inventore ritiene che un vaccino basato sul Tat dovrebbe essere in grado di indurre una risposta immunitaria, sia umorale che cellulare, sufficiente a bloccare o ridurre la replicazione o la trasmissione del virus e quindi a

proteggere dall'infezione, dalla malattia e dall'insorgenza dei tumori e di altre sindromi e sintomi associati all'AIDS. È possibile, quindi, impiegare il vaccino anti-Tat a scopi sia di prevenzione che di terapia. Infatti una risposta umorale contro Tat potrebbe neutralizzare gli effetti di Tat extracellulare riducendo e limitando l'infezione, e gli effetti del Tat extracellulare, mentre la risposta cellulo-mediata verso Tat e altre proteine virali, incluse nella formulazione vaccinale, dovrebbe distruggere le cellule replicanti il virus e, quindi, contenere l'infezione, e dare tempo sufficiente al sistema immune dell'ospite di sviluppare una risposta immune completa verso tutte le componenti virali in assenza di danni irreparabili dovuti all'alta replicazione virale.

Rivendicazioni

L'oggetto dell'invenzione riguarda:

1. un vaccino proteico o peptidico da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende proteine ricombinanti del Tat wild type e dei suoi mutanti (Seq. 1-5), espresse e purificate come descritto, o dei suoi peptidi wild-type o mutanti (Pep. 1-7), che siano somministrati da soli o coniugati con l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper;
2. un vaccino come descritto sopra, combinato con proteine ricombinanti o peptidi di Nef, Rev o Gag di HIV, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag o parte delle stesse;
3. un vaccino come descritto sopra, in combinazione con proteine ricombinanti di citochine immunomodulatorie, quali IL-12, IL-15 od altre molecole, o parti delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/IL12, Tat/IL-15 o Tat/altre molecole, o parte delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale;
4. un vaccino a DNA da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende vettori che codificano Tat wild-type o i suoi mutanti (Seq. 1-5), o parti di essi, inseriti nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori;
5. un vaccino a DNA come descritto al punto 4, in combinazione con molecole di DNA, inserite nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori, dei geni rev, nef e gag di HIV, o parte degli stessi, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/rev, tat/nef, tat/gag o parte degli stessi;
6. un vaccino a DNA come descritto sopra, in combinazione con molecole a DNA, basate sul plasmide pCV0 o altri vettori, dei geni per le citochine immunomodulatrici IL-12, IL-15 o altri geni immunomodulatori, o parte degli stessi, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/IL-12, tat/IL-15 o tat/altre molecole, o loro parti, in grado di potenziare la risposta immune antivirale;
7. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA da solo o combinato come sopra, descritto per l'immunizzazione con cellule dendritiche autologhe mediante trattamento ex vivo;
8. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto per l'immunizzazione mucosale (nasale, orale, vaginale o rettale);
9. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto, per l'immunizzazione ex vivo di cellule dal sangue periferico di soggetti infettati che siano esposte tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 ed anti-CD28 e reinfuse nell'ospite.
10. un vaccino terapeutico anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, come descritto, combinato con inibitori della replicazione virale.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, contro l'infezione da HIV, la progressione verso l'AIDS, lo sviluppo di tumori e di altre sindromi e sintomi insorgenti in soggetti infettati dal virus, che utilizzi molecole ricombinanti, proteiche, peptidiche e a DNA di Tat di HIV. Più in particolare, l'invenzione concerne un vaccino basato su Tat di HIV-1 come immunogeno, inoculato sotto forma di DNA e/o di proteina ricombinante o di peptidi, da solo o in combinazione con altri geni o prodotti genici virali (Nef, Rev, Gag) o parti di esse, oppure in combinazione con diverse citochine immunomodulatrici (IL-12, IL-15) o il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di esse. Tat, Nef, Rev, Gag e le citochine immunomodulatrici sono somministrati sia sotto forma di una miscela di proteine ricombinanti, di

peptidi o di proteine di fusione (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) che di DNA plasmidici. E' inoltre descritto un metodo di immunizzazione che utilizza cellule dendritiche autologhe trattate *ex vivo* con la proteina Tat ricombinante, o suoi peptidi, da sola, o con una miscela di proteine ricombinanti o peptidi (Tat, Nef, Rev, Gag) o con la proteina Tat e una o più citochine immunomodulatrici, o parti delle stesse, oppure trasdotte con vettori eucariotici contenenti Tat da solo, o con geni virali codificanti per Nef, Gag o Rev, oppure Tat e il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di essi. E' anche descritto l'uso per l'induzione di una risposta immune a livello mucosale. Il Tat, o suoi peptidi, da sola o in combinazione con con proteine virali e/o citochine è inoculata anche a livello mucosale per potenziare ed indurre la risposta immunitaria locale. La proteina Tat dell'HIV, o sue subunità, sarà anche utilizzata per immunizzare *ex vivo* linfociti CD4+ e CD8+ isolati dal sangue periferico di soggetti infetti. Successivamente, le cellule specifiche per l'antigene Tat saranno espanse *in vitro* mediante costimolazione con anticorpi monoclonali diretti contro il CD3 ed il CD28 e reinfuse. E' infine descritto l'uso di mutanti di Tat, identificati negli esempi, da utilizzare come immunogeni in alternativa a Tat wild type. I mutanti di Tat sono i) nella regione cisteinica (cys22) e ii) nella regione del core (lys41), iii) il mutante deleta della sequenza RGD: iv) il doppio mutante nella lisina 41 e nell'RGD. In alternativa all'uso di mutanti di Tat o peptidi di Tat (wild type o mutati in maniera analoga alla proteina) in caso di vaccinazione terapeutica si utilizzeranno, in congiunzione con l'immunogeno, inibitori della replicazione virale.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi specifici, illustrativi, ma non limitativi, in cui si farà riferimento alle seguenti figure.

Breve descrizione delle figure:

FIGURA 1. Test di CAT per determinare la capacità della proteina Tat-cys22 (Tat22) purificata di competere con l'attività transattivante della proteina Tat wild type. Cellule H3T1, contenenti integrato nel proprio genoma il vettore "reporter" HIV-1 LTR-CAT [Sodroski et al., Science 227:171, (1985)], in cui il gene per l'enzima cloramfenicolo acetil transferasi (CAT) è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore LTR di HIV-1, sono state incubate in presenza della proteina Tat wild type (100 ng) da sola o in combinazione con un eccesso molare di proteina Tat-cys22 (1 µg). L'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV-1 e la capacità della proteina Tat-cys22 di competere con Tat wild type, sono state determinate dopo 48 ore, sottoponendo aliquote degli estratti citoplasmatici (corrispondenti a 200 µg di proteine) al saggio per la determinazione dell'attività dell'enzima CAT, come descritto [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Sono indicate le percentuali (%) di acetilazione del ¹⁴C-cloramfenicolo.

FIGURA 2. Risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie vaccinate con la proteina Tat, determinata mediante saggi immuno-enzimatici (ELISA). (A) riporta i risultati ottenuti su due scimmie inoculate con 10 o con 100 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, per via sottocutanea in un sito; (B) riporta i risultati relativi alla scimmia di controllo non inoculata. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. La presenza della risposta anticorpale anti-Tat nei plasmi degli animali vaccinati veniva valutata mediante ELISA da noi allestiti e caratterizzati. La proteina Tat, era adsorbita ai pozzetti di piastre da 96 di PVC (100 ng/pozzetto in 200 µl di tampone carbonato 0.05 M pH 9.6) per 12 ore a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS-A 1x contenente Tween 20 (0.05%), si aggiungevano i sieri (in doppio) diluiti 1:50 in 200 µl di tampone carbonato, si incubava a 37°C per 90'. si lavavano i pozzetti con PBS-A 1x/Tween, 0.05% e si evidenziava la presenza degli immunocomplessi mediante l'aggiunta di 100 µl di anticorpo secondario (diluito 1:1000 in PBS-A 1x/Tween 0.1%/BSA 1%) coniugato con perossidasi di rafano, per 90' a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi dei pozzetti, si aggiungevano 100 µl di substrato della perossidasi (ABTS 1 mM, Amersham) per 30-45' a temperatura ambiente e quindi si procedeva alla lettura spettrofotometrica a 405 nm. Ogni saggio ELISA includeva un siero policonale di coniglio anti-Tat (controllo positivo) diluito da 1:200 a 1:6400, e i sieri delle scimmie prelevati al tempo 0 (controllo negativo) diluiti 1:50. Il valore di cut off è stato considerato come la media (± S.D.) delle letture dei sieri di tutte le scimmie, prelevati al tempo 0, ottenute in tutti gli esperimenti. I risultati riportati nell'istogramma relativi a ciascun campione corrispondono alla media delle densità ottiche

a 405 nm delle letture dei due pozzetti, sottratti del valore del cut off \pm S.D (Δ OD405). $>2,7$: i valori di lettura erano fuori scala.

FIGURA 3. Titolazione dei plasmi delle scimmie inoculate con 100 e 10 μ g di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2. I risultati in ordinata sono rappresentati come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 4. Analisi della risposta umorale anti-Tat specifica di tipo IgM in scimmie inoculate con Tat e determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate sottocute con 10 μ g di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate sottocute con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; 2 scimmie di controllo inoculate sottocute con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M7) e con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. In questo caso i sieri degli animali erano saggiati (in doppio) alla diluizione 1:100 e veniva utilizzato come anticorpo secondario un siero di capra anti-IgM di scimmia coniugato con perossidasi di rafano e diluito 1:1000.

FIGURA 5. Analisi della risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie inoculate con Tat determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; due scimmie di controllo inoculate con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M7) o con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. $>2,7$: il valore era fuori scala.

FIGURA 6. Titolazione dei sieri delle scimmie inoculate con la Tat ricombinante (10 μ g) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). I risultati sono rappresentati per ciascun siero come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 7. Analisi della risposta di ipersensibilità ritardata a Tat mediante esecuzione dello skin test. La proteina Tat (5, 1 e 0.2 μ g), risospesa in 150 μ l di PBS contenente lo 0.1% di BSA e il tampone in cui è risospesa Tat, erano inoculati intradermicamente in un'area tricotomizzata del dorso dell'animale. L'area trattata veniva fotografata al tempo 0 e dopo 24, 48 e 72 ore. Le scimmie di controllo erano inoculate solo con il tampone. Nella figura è riportato un esempio relativo alla 15^a settimana della scimmia M2 a 48 ore dopo l'inoculazione degli immunogeni. E' evidente una forte reazione positiva a Tat.

FIGURA 8. Cinetica della risposta proliferativa di PBMC di *Macaca fascicularis* alla costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 su biglie paramagnetiche (biglie anti-CD3/28). I PBMC isolati da sangue periferico erano depleti della sottopopolazione CD8 positiva tramite l'impiego di metodiche immunomagnetiche. Successivamente, parte dei linfociti CD8-depleti veniva stimolata con PHA e IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 3; la parte rimanente veniva fatta aderire alle biglie recanti gli anticorpi anti-CD3/28 ottenendo un popolazione di linfociti CD8-depleti e CD3/28 positivi. A questa frazione veniva ~~addizionata IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 10 di coltura. Le cellule erano contaminate e la loro vitalità determinata ogni 2-3 giorni. Il rapporto biglie : cellule veniva mantenuto costante. E' riportato il numero di cellule nel tempo.~~

FIGURA 9. Effetto antivirale della costimolazione con biglie anti-CD3/28 su PBMC di *Macaca fascicularis*. I linfociti CD8-depleti e CD8-depleti CD3+/CD28+, ottenuti con le metodiche descritte nella figura 8 da 4 scimmie, venivano stimolati come descritto nell'esempio 5. Le due frazioni erano infettate *in vitro* al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIVmac251/63M. La stimolazione veniva effettuata con PHA e IL-2 aggiunta dal giorno 3, e con le biglie anti-CD3/28 senza aggiunta di IL-2 esogena. La produzione virale veniva valutata determinando i livelli di p27 (ng/ml) sui sovrantanti delle colture al giorno 6 e 12 dall'infezione, come descritto nell'esempio 5.

Esempio 1. Espressione, purificazione e caratterizzazione della proteina Tat (isolato IIIB), proteine mutanti del Tat e peptidi wild type e mutanti di Tat.

Notevoli difficoltà sono state incontrate in passato per la purificazione ed il mantenimento dell'attività biologica della proteina Tat a causa della facilità con la quale si ossida, si aggrega e perde attività. Ciò è dovuto all'alto contenuto in cisteine che formano legami intra- ed inter-molecolari modificando la conformazione della proteina nativa [Viscidi et al., Science 246:1606 (1989); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Il cDNA del gene *tat* (Seq. 1, esempio 2), che è stato clonato nel vettore pL-syn fornitoci dai F. DeLamarter e B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S.A., Ginevra, Svizzera), è stato usato per l'espressione della proteina in E.Coli.

Un primo procedimento che abbiamo utilizzato e che ha portato all'ottenimento di una proteina prevedeva passaggi successivi di cromatografia liquida ad alta pressione e cromatografia a scambio [Bohan et al., Gene Expr. 2:391 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. La proteina così ottenuta era pura per oltre il 95% ed attiva [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)], tuttavia non si otteneva una buona riproducibilità da lotto a lotto, dovuta all'ossidazione della proteina, che rappresenta il problema principale con le preparazioni di Tat commerciali. In seguito alla nostra osservazione che la regione basica del Tat ha una forte affinità per l'eparina e che l'eparina ne impedisce l'ossidazione, abbiamo usato la cromatografia d'affinità con eparina e definito un nuovo protocollo di purificazione di Tat, come descritto da Chang et al., [AIDS 11: 1421 (1997)]. Cellule (10 gr. di peso) di *E.coli* esprimenti Tat erano sonicate in 40 ml di tampone di lisi (fosfato disodico 20mM, pH 7.8; glicerolo al 2.5%; PMSF 0.2 mM; DTT 5 mM; mannitolo 50 mM; acido ascorbico 10 mM; NaCl 500 mM) usando un Ultrasonic Liquid Processor (Modello XL2020, Heat System Inc) con tre scariche di 20 secondi ciascuna. Il lisato era centrifugato a 12.000 g per 30 minuti ed il sovrantante incubato per un'ora a temperatura ambiente con 2 ml di resina eparina sefariosio, pre-lavata con il tampone di lisi. La resina era caricata su una colonna di vetro e lavata con tampone di lisi fino a quando non era più misurata la proteina nel liquido di lavaggio. Il materiale legato era eluito con tampone di lisi contenente 2M NaCl e l'eluato raccolto in frazioni da 1 ml. L'omogeneità della proteina eluita era analizzata tramite elettroforesi su gel (SDS-PAGE). La proteina purificata era conservata liofilizzata a -70°C e risospesa in tampone degassato prima dell'uso.

L'attività biologica della proteina Tat purificata, secondo il protocollo appena descritto, era valutata con un saggio di "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-I, che derivano da cellule HeLa-CD4+ contenenti provirus difettivi nel gene *tat*, ottenute e descritte da Sadaie et al. [New Biol. 2:479 (1990)]. Il saggio di "rescue" dell'infezione virale, descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], consisteva nel complementare la mancanza di espressione di Tat nelle cellule HLM-i (2×10^5) mediante l'aggiunta di proteina Tat esogena (2 µg/ml) e valutando la replicazione virale tramite la determinazione, con un kit ELISA di "antigen capture" commerciale, della concentrazione dell'antigene p24 rilasciato nel terreno di coltura 48 ore dopo l'aggiunta della proteina Tat esogena. I risultati degli esperimenti di "rescue", descritti da Chang et al. [AIDS 11: 1421 (1997)], dimostrano che la proteina Tat, purificata tramite questa procedura era attiva e che questa procedura di purificazione era superiore, più semplice e meno costosa, sia per la purezza che per la sua attività biologica rispetto a quella descritta in precedenza [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol. 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)].

Diverse preparazioni di Tat ricombinante purificato come appena descritto sono state inoculate in presenza di adiuvante di Freund in topi e conigli, secondo protocolli standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. I risultati relativi alla risposta anticorpale indotta dall'immunizzazione sono riportati in Tabella 1.

TABELLA 1.

Analisi della risposta anticorpale specifica anti-Tat nei sieri di topi e conigli immunizzati con la proteina Tat ricombinante^a.

Anticorpo anti-Tat	OD-ELISA/Tat			Western blot
	1:500	1:1000	1:2000	
Coniglio	0.651	0.400	0.175	+
Topo	0.502	0.240	0.150	+

^aLa proteina Tat ricombinante prodotta in *E.coli* è stata utilizzata per immunizzare topi e conigli secondo protocolli di immunizzazione standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold

Spring Harbor Laboratory (1988)]. I sieri degli animali immunizzati sono stati analizzati mediante saggio ELISA per la presenza di anticorpi anti-Tat utilizzando tre diluizioni del siero (1:500 a 1:2000). I risultati riportati rappresentano la media delle letture a 405 nm di due conigli e tre topi. I sieri sono stati inoltre saggiati mediante Western blot sulla proteina Tat ricombinante (100 ng) migrata in gel SDS-poliacrilamide. I risultati della Tabella 1 dimostrano che Tat ricombinante da noi prodotta era in grado di indurre una risposta anticorpale in ambedue le specie di animali, come saggiato mediante ELISA e Western blot, utilizzando come antigene la proteina Tat ricombinante. Questi anticorpi erano in grado di inibire l'internalizzazione e le attività biologiche del Tat [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol. 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)]. Il vettore pL-syn ed il protocollo di purificazione della proteina Tat sono impiegati per esprimere e purificare i mutanti di Tat descritti nell'Esempio 2. L'attività biologica delle proteine Tat mutate purificate è misurata tramite saggi di "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1, saggi di proliferazione cellulare in cellule di KS ed in vivo nel topo, come descritto sopra per la proteina Tat wild-type. Inoltre, le proteine Tat mutate sono saggiate in presenza di Tat wild-type (a concentrazioni seriali) per verificare l'effetto transdominante negativo sulla replicazione virale in saggi di "rescue" in cellule HLM-1. Il vettore pL-syn e il protocollo di purificazione sono impiegati per esprimere e purificare proteine di fusione così composte: Tat (wild type o i suoi mutanti)/IL-12 o Tat (wild type o i suoi mutanti)/IL-15 o parti delle stesse oppure Tat (wild type o suoi mutanti)/altre molecole (o parte delle stesse) che si dimostrino in grado di potenziare la risposta immune al Tat da solo od associato ad altri prodotti virali. Le molecole ricombinanti di fusione sono costruite utilizzando le sequenze e i primers descritti negli esempi 2 e 3. Alternativamente come immunogeni sono utilizzati peptidi sintetici corrispondenti a regioni di Tat o di altri prodotti virali o di citochine da usare in combinazione con Tat. Le sequenze peptidiche di Tat sono le seguenti:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

I peptidi mutati di Tat conterranno le stesse sostituzioni aminoacidiche delle proteine Tat mutate descritte nell'esempio 2. I peptidi saranno utilizzati in combinazione con il peptide rappresentante l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper [Lanzavecchia. Science 260: 937 (1993)].

Esempio 2. Costruzione e caratterizzazione dei mutanti del gene tat

Abbiamo prodotto 19 mutanti in diverse regioni di Tat, mediante mutagenesi sito specifica o per delezione. La sequenza di ciascun DNA mutato è stata controllata mediante sequenziamento. I cDNA del gene tat mutati sono stati clonati nel sito PstI del vettore pCV0, descritto nell'Esempio 3. Ciascun mutante è stato cotrasferito, come descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], in cellule COS-1, o nella linea di linfociti T Jurkat, con il plasmide HIV-1 LTR-CAT, in cui il gene reporter CAT è posto sotto il controllo trascrizionale dell'LTR di HIV-1. I risultati di questi esperimenti non sono pubblicati e sono riportati in Tabella 2.

TABELLA 2.

Effetto dei mutanti di Tat sulla transattivazione dell'HIV-1 LTR-CAT ed effetto di blocco (transdominante negativo) sull'attività di Tat wild-type

MUTANTI	Attività transattivante ^a		Attività transdominante ^b
	Media (fold)	(valori min-max)	(% inibizione) Media
CYS 22	0.09	(.021-.22)	21
THR 23	0.36	(.16-1)	
THR 23A	0.30	(.16-.78)	
ASN 24	0.34	(.34-.82)	
ASN 24A	0.42	(.45-.95)	
TYR 26	0.14	(.08-.19)	
LYS 28/29	0.52	(.19-1.04)	
CYS 30	0.30	(.045-.65)	
CYS 31	0.60	(.27-1.09)	
PHE 32	0.31	(.077-.097)	
LYS 33	0.04	(.0027-.068)	46
GLU 35	0.31	(.19-.43)	
PHE 38	0.05	(.043-.057)	98
LYS 41	0.04	(.025-.061)	97
TYR 47	0.58	(.31-.8)	
57 A	0.35	(.26-.44)	
TAT-RGD	0.94	(.73-1.15)	
TAT-KGE	1.11	(.67-1.49)	
TAT wild-type	1	1	

^aI risultati sono riportati come incrementi di attivazione relativi ai valori di attività CAT indotti dal Tat wild type (Fold = 1). ^bI risultati sono espressi in percentuale (%) di inibizione dell'attività del Tat wild type.

Dai risultati presentati in Tabella 2 si osserva che per la maggior parte dei mutanti l'effetto transattivante l'LTR di HIV-1 era molto ridotto o assente, ad eccezione del mutante per delezione della sequenza RGD che aveva attività paragonabile al Tat wild-type. Abbiamo scelto i 4 mutanti (cys22, lys33, phe38, lys41) con la più bassa attività transattivante (quasi nulla), e ne abbiamo determinato l'effetto transdominante negativo sull'attività transattivante di Tat wild-type. A questo scopo cellule COS-1 erano co-trasfettate con ciascun vettore contenente un mutante di Tat ed il vettore pCV-Tat (nel rapporto molare di 10:1) in presenza del vettore HIV-1 LTR-CAT. Come si osserva in Tabella 2, i mutanti lys41 e tyr47 inibivano pressoché completamente l'attività di Tat, mentre i mutanti lys33 e cys22 inibivano parzialmente l'attività di Tat. Tuttavia, la proteina ricombinante cys22 (descritta nel successivo Esempio 3) era in grado di competere con la proteina Tat wild-type nel transattivare l'HIV-1 LTR-CAT (figura 1). Sono stati scelti un mutante nella regione cisteinica (cys22), uno nella regione core (lys41), uno nel secondo esone di Tat deletto della sequenza RGD (RGDΔ) ed un doppio mutante contenente la mutazione nella lys41 e la delezione della sequenza RGD (lys41-RGDΔ).

La sequenza dell'insero tat e dei mutanti selezionati per la vaccinazione e' riportata qui di seguito. E' descritta una serie di mutanti nel gene tat che sono stati preparati per 1) sostituzione di una base per dar luogo ad una sostituzione aminoacidica e 2) delezione di una sequenza di basi per dar luogo ad una delezione dei corrispondenti aminoacidi. Le sostituzioni e delezioni delle basi sono state ottenute per mutagenesi sito-diretta. Le sequenze del gene tat wild-type e dei mutanti del gene tat, riportate qui di seguito sono state inserite nel vettore plasmidico pCV0 come descritto in precedenza.

Per Seq. 1 si intende la sequenza del gene tat di HIV-1, clone BH-10 e della sua proteina derivata. Per Seq. 2 si intende la sequenza del mutante cys22 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 66 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Guanina (G). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Cisteina (C in codice ad una lettera) in posizione 22 dall'estremità amino-terminale, con una Glicina (G in codice ad una lettera).

Per Seq. 3 si intende la sequenza del mutante lys41 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 123 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Citosina (C). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Lisina (K in codice ad una lettera) in posizione 41 dall'estremità amino-terminale, con una Treonina (T in codice ad una lettera). Per Seq. 4 si intende la sequenza del mutante RGD (e della sua proteina derivata), rappresentata dalla delezione della sequenza nucleotidica CGAGGGGAC, che va dal nucleotide 232 al nucleotide 240, a partire dall'estremità 5' della sequenza del gene *tat* wild-type. Tale delezione origina, nella sequenza aminoacidica derivata, una delezione degli aminoacidi Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD nel codice ad una lettera) nelle posizioni 78-80 a partire dall'estremità amino-terminale. Per Seq. 5 si intende la sequenza del doppio mutante lys41-RGD Δ (e della sua proteina derivata), un originato dalla combinazione dei mutanti sopradescritti.

Sequenza nucleotidica di *tat* wild-type (Seq. 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCCAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSL
SKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante *cys22* (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACTGCGGTACCAATTGCT
ATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
GGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRR
PPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica *lys41* (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCCAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRR
PPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante RGD Δ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRR
RPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante *lys41*-RGD Δ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH2-MEPVDPRLPEWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFTTALGISYGRKRRQR
RPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

NOTA BARTOLU

Esempio 3. Costruzione e caratterizzazione degli immunogeni a DNA.

Le molecole di DNA per l'inoculazione degli animali sono costruite nel vettore plasmidico pCV0 di 6.4 kb [Arya et al., Science 229:69 (1985)]. Questo plasmide comprende due origini di replicazione di SV40, il "major late promoter dell'adenovirus" (AdMLP), e le sequenze di splicing dell'adenovirus e dei geni delle immunoglobuline di topo, il cDNA del gene della diidrofollato-reduttasi di topo (dhfr) e il segnale di poliadenilazione di SV40. Il sito per l'enzima di restrizione PstI è localizzato a 3' del AdMLP, rappresenta il sito in cui è clonato il gene esogeno di interesse. Il cDNA del gene *tat* (261 coppie di basi) (Seq. 1, esempio 2) di HIV era derivato dal ceppo BH10 [Ratner et al., Nature 313:277 (1985)] e codifica per una proteina di 86 aminoacidi. Il vettore pCV-Tat [Arya et al., Science 229:69 (1985)] era ottenuto clonando il cDNA del gene *tat* nel sito PstI di pCV0 il cDNA del gene *tat*, che pertanto era posto sotto il controllo trascrizionale dell'AdMLP. La scelta di questo vettore si basa sul fatto che l'AdMLP induceva una più elevata espressione del gene *tat*, rispetto ad altri promotori eucariotici, come, per esempio, "l'immediate early region promoter" del citomegalovirus (CMV) come dimostrato da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], e riportato nella Tabella 3.

TABELLA 3.

Espressione, localizzazione subcellulare, rilascio ed attività di Tat in cellule COS-1 transfettate con pCV-Tat e CMV-Tat.

Vettori	Espressione di Tat			Contenuto di Tat ^b			Attività di Tat	
	Nucleo ^c (%)	Citoplasma ^c		Totale	Intracell. (%)	Extracell. (%)	Intracell. ^d (fold)	Extracell. ^e (cpm)
Cellule Positive								
pCV-Tat	5-10	++	++	25	63.5	36.5	50	2,478
CMV-Tat	3-5	++	+	14.6	92.2	7.8	72	2,254
Controllo	0	-	-	0	0	0	1	1,400

^aCellule COS-1 (5×10^6) sono state trasfettate mediante elettroporazione con 30 µg di pCV-Tat, CMV-Tat o un DNA di controllo. Quarantotto ore dopo la trasfezione, l'espressione di Tat è stata valutata mediante immunocistochemica con anticorpi monoclonali anti-Tat (i risultati sono riportati come media dei valori della percentuale delle cellule positive) e determinando la localizzazione di Tat nucleare e citoplasmatica. La presenza di Tat intra- ed extra-cellulare è stata analizzata mediante radioimmunoprecipitazione sugli estratti cellulari (500 µl) e nei terreni di cultura (4 ml) e successiva lettura densitometrica (Gelscan XL; Pharmacia) delle bande di Tat precipitate. L'attività del Tat intracellulare è stata misurata su estratti cellulari di cellule COS-1 cotrasfettate con i vettori esprimenti Tat, o il vettore di controllo, ed il plasmide HIV-1 LTR-CAT; l'attività del Tat extracellulare sull'induzione della proliferazione di cellule AIDS-KS (determinata mediante saggio di incorporazione della timidina triziata) è stata misurata nel terreno di cultura (diluito 1:2 e 1:4) delle cellule trasfettate con i plasmidi esprimenti Tat o il plasmide di controllo. I risultati corrispondono alla media di 5 esperimenti indipendenti.

^bAnalisi densitometrica della banda della proteina Tat immunoprecipitata. I valori sono espressi in una scala arbitraria, essendo 10 il valore minimo totale (Tat intra- ed extracellulare) evidenziato.

^c-, negativo; +, 50% di cellule Tat-positive; ++, 50-100% di cellule Tat-positive.

^dAttività CAT dopo 20 minuti di incubazione rispetto al vettore di controllo, il cui valore di attivazione è considerato uguale a 1.

^eLa crescita delle cellule AIDS-KS è stata misurata mediante un saggio di incorporazione di timidina triziata (deviazione standard, DS: 12%). Il terreno delle cellule trasfettate con il DNA di controllo determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 1,400 cpm (DS: 11.5%). Il terreno di cultura derivato da linfociti contenenti il virus HTLV-II (controllo positivo) determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 2,400 cpm (DS: 10%).

Dai risultati della Tabella 3 si osserva che nelle cellule trasfettate con pCV-Tat, rispetto alle cellule transfettate con CMV-Tat, la percentuale di cellule Tat-positive ed il contenuto totale di Tat è maggiore, la

quantità di Tat rilasciata è molto più elevata e correla con il contenuto totale e citoplasmatico di Tat, e l'attività biologica di Tat extracellulare sulla crescita delle cellule AIDS-KS è conseguentemente maggiore. Questi risultati indicano che il vettore pCV-Tat codifica per una proteina biologicamente attiva, induce alti livelli di espressione del cDNA del gene tat ed è in grado di rilasciare dalle cellule quantità di Tat molto maggiori rispetto al vettore CMV-Tat.

Il vettore pCV0 è utilizzato anche per l'espressione dei geni nef, rev e gag di HIV-1 e dei geni codificanti per le citochine IL-12 ed IL-15. I cDNA dei geni nef (618 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)] e rev (348 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], il gene gag (1500 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], o i cDNA dei geni IL-12 [Wolf et al., J. Immunol. 146:3074 (1991)] o IL-15 [Grabstein et al., Science 264:965 (1994)] sono amplificati mediante la tecnica della "polimerase chain reaction" (PCR) utilizzando primers specifici complementari ai primi 15 nucleotidi della regione 5' (primer forward) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) o agli ultimi 15 nucleotidi della regione 3' del gene (primer reverse) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Inoltre, ciascun primer, sia forward che reverse, include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI in modo da consentire la clonazione dell'amplificato nel vettore pCV0. Dopo la clonazione si controlla la sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA. Il vettore pCV0 è utilizzato anche per la co-espressione di Tat con altri geni virali di HIV-1 (rev, nef o gag) o con i geni delle citochine IL-12 o IL-15. A questo scopo il cDNA del gene tat di HIV-1 di 261 coppie di basi (Seq. 1, esempio 2) è amplificato mediante PCR con un primer forward che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P11) e un primer reverse complementare agli ultimi 15 nucleotidi del gene tat (Seq. P12). I geni virali (nef, rev o gag) o i geni delle citochine IL-12 o IL-15 sono amplificati con un primer forward che include inoltre una sequenza di 15 basi complementare alla regione 3' del gene tat, tale da permettere che il gene sia "in frame" con il gene tat (Seq. P13, P14, P15, P16, P17), ed un primer reverse che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Successivamente si esegue una terza reazione di PCR in cui il DNA template è rappresentato dagli amplificati del gene tat e del gene di interesse, il primer forward è rappresentato dal primer utilizzato per amplificare tat (Seq. P11) e il primer reverse da quello utilizzato per amplificare il gene di interesse (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). L'amplificato tat/gene di interesse è purificato in gel di agarosio, digerito con PstI e clonato in pCV0. Dopo la clonazione si controlla la sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA, mentre l'espressione della proteina si determina mediante trasfezione come descritto in precedenza (Ensoli et al., J. Virol. 67: 2771993).

Sono riportate le sequenze dei primers sopra menzionati.

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTTCAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTTTCGAAA3'

Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5'GGCCCGAAGGAAATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5'GGCCCGAAGGAAATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5'GGCCCGAAGGAAATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5'GGCCCGAAGGAAATGAGAATTTTCGAAA3'

Esempio 4. Inoculazione in *Macaca fascicularis* sani di un vaccino anti-Tat proteico: valutazione della sicurezza, tollerabilità, risposta immune specifica.

La tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare) della proteina Tat ricombinante prodotta con il metodo descritto e purificata tramite colonne di affinità di eparina è stata valutata nel modello sperimentale dei primati non umani delle scimmie cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Per attivare un'ampia risposta immune con un vaccino proteico abbiamo usato l'idrossido di alluminio (Alum) che è stato sperimentato in numerosi modelli ed è l'unico approvato per la sperimentazione nell'uomo. Tra gli adiuvanti particolari abbiamo usato il RIBI (appartenente al gruppo degli emulsionanti e composto da lipide A monofosforilico, dimicolato trealosico e scheletro della parete batterica del bacillo di Calmette-Guerin) [Audibert et al., Immunol. Today 14:281 (1993); Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994)].

Nel primo esperimento pilota abbiamo inoculato 3 scimmie secondo il seguente schema:

1) Proteina Tat ricombinante (100 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 2) Proteina Tat ricombinante (10 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 3) Scimmia di controllo non inoculata. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue nei giorni -42 e -35 antecedenti la prima vaccinazione per la determinazione dei parametri di base. Campioni di sieri e di plasma sono stati congelati a -20° o -80°C ed utilizzati successivamente per risospendere l'inoculo proteico. Le scimmie 1 e 2 erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Negli stessi giorni dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina), la valutazione di parametri immunologici, quali la presenza di immunoglobuline specifiche (IgM, IgG, IgA) i livelli di citochine del tipo Th1 (IL-2, IFN γ) e Th2 (IL-4, IL-10), IL-15, la produzione di chemochine (Rantes, MIP-1 e MIP-1), il fenotipo linfocitario (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56 e HLA-DR, CD45RA e CD45RO), la risposta proliferativa a Tat, la presenza di attività CTL e NK, e la presenza di attività antivirale mediata dalle cellule CD8⁺ (CAF). Inoltre, per valutare in vivo la presenza di una risposta cellulo-mediata, tutte le scimmie vaccinate e quella di controllo erano sottoposte a "skin-test" per Tat. Questo esperimento pilota prevede un ulteriore richiamo di tutte le scimmie alla 32^a settimana ed infine un richiamo con la proteina Tat risospesa in Iscom (immune stimulating complex). L'Iscom è un adiuvante composto dalla saponina Quil A, colesterolo e fosfolipidi in grado di incrementare la risposta umorale e cellulare [Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994); Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)]. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il "challenge" delle scimmie, vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ (50% monkey infectious doses) di "simian immunodeficiency virus" (SHIV) cresciuto e titolato in *Macaca fascicularis* e contenente il gene tat e/o il gene nef e rev di HIV [Shibata et al., J. Virol. 65:314 (1991); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994); Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995); Reinmann et al., J. Virol. 31: 98 (1996)]. Il monitoraggio post-challenge (ogni 2 settimane a partire dal giorno del challenge per il primo mese, ogni 4 settimane per i successivi 3 mesi, ed ogni 8 settimane fino a 6 mesi dal challenge) includerà anche l'analisi di parametri virologici quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. I risultati di questo esperimento relativi alle prime 27 settimane dall'inizio del protocollo sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che la proteina Tat era ben tollerata dagli animali e non era tossica nelle dosi somministrate, utilizzando le vie di inoculazioni scelte. Nelle scimmie 1 e 2 erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 5^a settimana dopo la prima inoculazione. Alla 27^a settimana IgG anti-Tat erano evidenziabili alla diluizione di 1:3200 e 1:6400 nel plasma della scimmia 1 e 2 rispettivamente. I risultati sono riportati nelle figure 2 e 3. I risultati attualmente disponibili dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana (Tabella 4) nelle scimmie inoculate con il Tat, essendo maggiore nella scimmia 2 che riceveva ad ogni inoculazione 10 µg di proteina Tat ricombinante.

TABELLA 4

Risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana post-immunizzazione^a

N° scimmia	Stimolo	Indice di stimolazione
1	PHA	13,95
	TT	4,68
	Tat	2,45
2	PHA	11,57
	TT	3,77
	Tat	3,04
3	PHA	19,9
	TT	6,23
	Tat	1,38

^aLinfociti di sangue periferico isolati mediante gradiente di Ficoll e seminati a 2×10^5 cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96 pozzetti, erano cresciute in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e coltivate con Tat (5 µg/ml), PHA (4 µg/ml), o tossoide del tetano (TT) (10 µg/ml), contro cui tutti le scimmie erano vaccinate. Campioni di controllo erano incubati solo con il terreno di crescita. L'incremento della proliferazione cellulare era determinata al 5° giorno con saggio di incorporazione di timidina triziata come descritto [Ensolì et al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241 (1988); Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)]. I risultati sono riportati come indice di stimolazione (che era calcolato secondo la seguente formula: Media dei cpm del campione/media dei cpm dei controlli. Sono considerati positivi i valori superiori a 2). Le scimmie 1 e 2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 µg o 10 µg, rispettivamente) risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia 3 è una scimmia di controllo non inoculata.

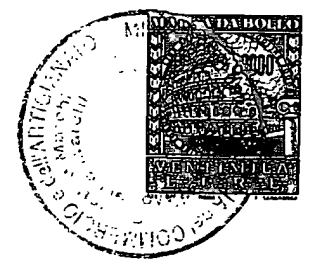
I risultati di questo esperimento pilota indicano che la proteina Tat ricombinante, prodotta e purificata con il protocollo da noi descritto, non era tossica alle dosi di 100 e 10 µg inoculate per via sottocutanea ed era in grado di indurre una risposta immune specifica sia umorale che cellulo-mediata. La risposta immune specifica anti-Tat era maggiore nella scimmia 2, immunizzata con 10 µg di proteina ricombinante. Inoltre, anche l'adiuvante RIBI non era apparentemente tossico negli animali.

Un esperimento iniziato successivamente abbiamo valutato l'effetto dell'immunizzazione indotta da Tat in combinazione con il RIBI o con l'Alum. Le scimmie sono state inoculate per via sottocutanea in un unico sito secondo il seguente schema. Scimmie 1-3 : 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI. Scimmie 4-6: 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum. Scimmia 7: RIBI 250 µl e 250 µl di siero autologo. Scimmia 8: Alum 250 µl e 250 µl di siero autologo. Da tutte le scimmie sono stati prelevati 10 ml di sangue al giorno -9, antecedente la prima vaccinazione, per potere eseguire le analisi descritte nel primo esperimento pilota e disporre dei parametri di base di ciascun animale. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. Negli stessi giorni dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami descritti nel primo esperimento pilota. Inoltre, sono prelevati campioni di urine ed eseguiti tamponi vaginali sui quali sarà determinata la presenza di IgA secrete specifiche. Questo esperimento pilota prevede due richiami alla 21^a e 26^a settimana delle scimmie 1-6 con l'immunogeno proteico ed adiuvanti e delle scimmie 7 e 8 con solo gli adiuvanti. Infine, verrà eseguito un ultimo richiamo alla 31^a settimana con la proteina Tat risospesa in Iscom. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il challenge delle scimmie, vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 40^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ di SHIV. Il monitoraggio post-challenge verrà eseguito come descritto per il primo esperimento pilota.

I risultati del secondo esperimento pilota, attualmente disponibili e relativi alla 15^a settimana dall'inizio della vaccinazione, sono i seguenti. Negli animali non si osservavano alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Le scimmie non presentavano infiammazione o segni di neovascolarizzazione nei siti di inoculazione. E' stata dimostrata la presenza di una risposta anticorpale (IgM, IgG) specifica. Alla 15^a settimana i titoli anticorpali (IgG) anti-Tat raggiungevano valori elevati e variabili da 1:12.800 a titoli maggiori di 1:50.000 (figure 4-6). Inoltre l'attività neutralizzante il Tat del siero delle scimmie vaccinate veniva saggiata mediante saggi di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come precedentemente descritto [Ensoli et al., J. Virol. (1993)]. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1-6 diluiti 1:2 ottenuto alla 15^a settimana dal primo inoculo erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel supernatante delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) o i controlli negativi non avevano attività bloccante verso il Tat (Tabella 5).

TABELLA 5
Attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare.

Campioni	HIV-1 p24 (pg/ml)
Tat	61.88
Tat + Siero preimmune M1	46.80
Tat + Siero preimmune M2	22.96
Tat + Siero preimmune M3	96.98
Tat + Siero preimmune M4	126.68
Tat + Siero preimmune M5	27.03
Tat + Siero preimmune M6	78.61
Tat + Siero immune M1	4.77
Tat + Siero immune M2	4.88
Tat + Siero immune M3	Neg.
Tat + Siero immune M4	Neg.
Tat + Siero immune M5	7.88
Tat + Siero immune M6	4.55
Pool M1-6 (controllo preimmune)	Neg.
Pool M1-6 (controllo immune)	Neg.
PBS + 0.1% BSA	Neg.



L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1 (cellule HeLa contenenti integrata una copia del provirus HIV-1 difettivo del gene tat). Cellule HLM-1 sono state piastrate a concentrazione di 6×10^5 pozzetti in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37°C per 16 ore. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0.1%, ed incubate per 48 ore con terreno di crescita (0.3 ml) a cui veniva aggiunta la proteina Tat ricombinante (30 ng/ml) da sola o in presenza di un ugual volume di siero (diluito 1:2) delle scimmie prelevati al tempo 0 (sieri preimmuni) o alla 15^a settimana (sieri immuni). I controlli erano rappresentati dalle cellule trattate solo con un pool dei sieri preimmuni, immuni, o con PBS contenente BSA allo 0.1% (PBS + 0.1% BSA) ma in assenza di Tat. Ogni campione è stato saggiato in doppio. Sui supernatanti cellulari era quindi determinata la presenza di virus rilasciato dalle cellule mediante determinazione dei valori di antigene p24, utilizzando un kit commerciale p24 antigene capture - Elisa (Nen Dupont). I risultati sono espressi come valori di p24 (pg/ml) presenti nei terreni e corrispondono alla media dei valori ottenuti dai due pozzetti per ciascun campione.

Alla 11^a settimana era inoltre evidente una risposta proliferativa specifica al Tat nelle scimmie 2 e 3 inoculate con la proteina Tat ed il RIBI e nella scimmia 4 inoculata con la proteina Tat e l'Alum che aumentava alla 15^a settimana (Tabella 6).

TABELLA 6.

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dell'inizio della immunizzazione			
		0	6	11	15
1	PHA	16,96	22,83	10,50	15,27
	TT	11,69	2,16	1,96	3,01
	Tat	1,12	1,94	1,55	0,52
2	PHA	31,27	29,37	25,75	21,28
	TT	1,12	2,16	1,8	0,57
	Tat	1,08	2,05	3,65	6,22
3	PHA	22,42	39,15	7,89	16,88
	TT	11,43	1,72	0,95	1,71
	Tat	1,65	1,44	2,69	18,82
4	PHA	3,88	13,85	20,77	15,22
	TT	2,85	3,90	4,49	9,07
	Tat	1,29	1,88	3,01	3,24
5	PHA	6,50	11,39	5,74	16,74
	TT	2,31	3,22	1,07	4,84
	Tat	1,80	1,02	0,66	1,76
6	PHA	11,96	7,01	17,94	2,77
	TT	4,14	5,01	1,71	0,13
	Tat	1,37	2,47	1,06	0,11
7	PHA	21,65	25,20	20,30	37,93
	TT	0,97	1,30	0,80	0,88
	Tat	1,78	1,12	0,68	0,73
8	PHA	26,51	21,44	67,09	16,38
	TT	1,20	2,03	10,78	0,20
	Tat	1,12	0,97	0,00	0,21

^aLinfociti di sangue periferico isolati, piastrati e cresciuti come descritto, venivano stimolati con PHA (4 µg/ml), il tossoide tetanico (TT) e Tat (5 o 1 µg/ml) e saggiati, come descritto in Tabella 4. Le scimmie 1-3 erano inoculate con 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI; 3 scimmie 4-6 erano inoculate oppure con 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 µl e 250 µl di siero autologo)(scimmia 7) e con Alum (250 µl e 250 µl di siero autologo)(scimmia 8).

Inoltre, alla 15^a settimana 5 scimmie inoculate con la proteina ricombinante (scimmie 2-6) reagivano allo skin test, ulteriormente indicando la presenza di una risposta cellulo-mediata evidenziata da una forte reazione di ipersensibilità ritardata (Tabella 7 e figura 7).

TABELLA 7.
Skin-test al Tat^a

N° scimmie	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione	
	11	15
1	-	-
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	+	+
6	-	+
7	ND	ND
8	ND	ND

^aTat (5, 1 e 0.2 µg) in 150 µl di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a ed alla 15^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. La comparsa di eritema dopo 24, 48 o 72 ore veniva considerata come risposta positiva.

Questi risultati indicano che l'immunogeno, nonché entrambi gli adiuvanti RIBI e alum, erano ben tollerati dagli animali e non erano tossici, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione con Tat ottenuti nel primo esperimento pilota. Inoltre, questi dati confermano l'osservazione riportata nel primo esperimento ovvero che la proteina ricombinante Tat induce una forte risposta umorale e cellulare specifica anti-Tat in vitro e in vivo.

Esempio 5. La costimolazione con biglie anti-CD3/28 di linfociti CD4+ purificati da scimmie infette con SIV+ induce l'espansione logaritmica del numero delle cellule in assenza di significativa replicazione e propagazione del virus.

Le cellule del sangue periferico sono state deplete della sottopopolazione CD8+ mediante l'impiego di biglie paramagnetiche anti-CD8 (Dynal. Oslo; Dynabeads M-450 CD8) e la purezza delle popolazioni ottenute è stata valutata tramite l'analisi citofluorimetrica e considerata accettabile se maggiore del 95%. Le cellule CD8 deplete (denominate CD8⁻PBMC) sono state messe in coltura e stimulate con PHA (2µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o con biglie paramagnetiche previamente coniugate con due anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD3 (Clone FN18, Biosource) e CD28 (Clone 9.3, omaggio del Dr. Carl June) (biglie anti-CD3/28). Allo scopo di facilitare il legame con le biglie anti-CD3/28 l'incubazione è avvenuta su un dispositivo rotante e le cellule coniugate, selezionate con l'ausilio di un magnete, sono state denominate CD8-CD3+CD28+ e poste in coltura. La concentrazione delle cellule è stata riportata a quella di partenza 3 volte a settimana ed è stata aggiunta IL-2 ove indicato: inoltre per quanto riguarda le cellule stimulate con biglie anti-CD3/28, esperimenti preliminari hanno dimostrato la convenienza dell'utilizzo di un regime di stimolazione continua ripristinando il rapporto ottimale biglie:cellule ad ogni conta eseguita. Nostri studi hanno infatti dimostrato che in assenza di IL-2 esogena la sottopopolazione CD8-CD3+CD28+ prolifera significativamente meglio delle cellule CD8⁻PBMC in risposta alla costimolazione con biglie anti-CD3/28 e che l'aggiunta di IL-2 (40 U/mL, 3 volte alla settimana) migliora significativamente la cinetica di proliferazione sia per durata che per numero di cellule ottenute (figura 8).

Allo scopo di valutare l'attività antivirale, cellule CD8-CD3+CD28+ purificate da 4 animali SIV⁻ sono stati infettati al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIV e mantenute in condizioni di stimolazione continua; come controllo sono stati impiegati CD8⁻PBMC stimolati con PHA e IL-2. L'andamento dell'infezione è stato monitorato mediante determinazione dell'antigene virale p27gag nei sovrantanti delle colture utilizzando un kit ELISA commerciale (Coulter, Hialeah, FL). I livelli di p27 (ng/ml) misurati al giorno 6 e 12 post infezione e riportati in Figura 9 hanno indicato una netta differenza fra le due condizioni di stimolazione in termini di produttività dell'infezione. Infatti al giorno 6 la riduzione percentuale della p27 rispetto ai campioni stimolati con PHA e IL-2 era compresa fra il 40% e l'87% e al giorno 12 tale riduzione era incrementata in 2 soggetti su

4 suggerendo una minore permissività delle cellule all'infezione virale. In un solo caso (mk 9401), abbiamo registrato la propagazione dell'infezione anche nella condizione di stimolazione con biglie anti-CD3/28. I risultati descritti dimostrano che il *Macacus fascicularis* rappresenta un buon modello per la espansione ex vivo di sottopopolazioni linfocitarie in assenza di significativa replicazione virale mediante costimolazione con biglie anti-CD3/28 e costituisce il razionale per un vaccino terapeutico basato sulla espansione e reinfusione, in soggetti infetti con HIV, di linfociti autologhi specifici per gli antigeni virali proposti.

Esempio profetico 6. Inculazione in *Macaca fascicularis* di un vaccino anti-Tat a DNA.

E' proposta l'inoculazione diretta del DNA del plasmide pCV-Tat, contenente il cDNA del gene *tat* wild-type, e pCV0 come DNA di controllo. I DNA plasmidici da somministrare agli animali, sono amplificati in batteri E.Coli (ceppo DH5) secondo procedure standard [Molecular cloning - A Laboratory manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] e secondo protocolli stabiliti dalla "European Agency for the evaluation of medicinal products: Human Medicine Evaluation Unit" (Technical Report Series No. 17 January 1997), purificati mediante due gradienti di CsCl e dializzati per 48-72 ore contro 100 volumi di PBS (senza Ca++ e Mg++) sterile. I DNA sono controllati mediante digestione con enzimi di restrizione, i cui siti di taglio sul DNA plasmidico sono noti, e la loro funzionalità controllata mediante transfezione di 5-10 µg di DNA con la tecnica del fosfato di calcio [Molecular cloning - A Laboratory Manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] in cellule H3T1 (1 x 10⁶), che derivano da cellule HeLa contenenti integrato una copia del plasmide reporter HIV-1 LTR-CAT, e 48 ore dopo determinazione dell'attività dell'enzima CAT [Gorman et al. Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982)].

I DNA di pCV-Tat o di pCV0 (0.5-2 mg) risospesi in soluzione fisiologica saranno inoculati per via intramuscolare in due siti. 2-5 giorni prima della vaccinazione, gli animali verranno inoculati con 1 ml di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente verrà eseguita la vaccinazione, per aumentare l'uptake e l'espressione del DNA nel muscolo [Danko et al., Vaccine 12:1499 (1994); Fine et al., Ann. Plast. Surg. 20:6 (1988)]. Le scimmie saranno inoculate al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Infine alla 32^a settimana sarà eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza di Iscom. Gli animali saranno osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'esempio 4. Inoltre si preleveranno campioni di 10 ml di sangue prima dell'inizio della immunizzazione e negli stessi giorni della inoculazione come descritto nell'esempio 4. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà determinato dopo il "challenge" delle scimmie, che sarà attenuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID50 di SHIV. Il monitoraggio post-challenge sarà effettuato come descritto nell'esempio 4. Saranno valutati anche protocolli di immunizzazione in cui saranno usate combinazioni dei DNA esprimenti gli altri geni di HIV-1 e/o citochine, descritti nell'esempio 3.

I DNA di plasmidi pCV0 e pCVTat possono essere inoculati negli animali utilizzando altri sistemi di "delivery" che potrebbero rendere più efficace l'immunizzazione, quali l'uso di liposomi, nanoparticelle o "gene gun".

Esempio profetico 7. Uso delle cellule dendritiche

I precursori di cellule dendritiche saranno isolati dal sangue periferico di primati non umani appartenenti alla specie *Macaca fascicularis* mediante coltura in vitro di cellule aderenti con GM-CSF e IL-4 per 7-14 giorni. L'analisi morfologica e la caratterizzazione fenotipica (FACS analisi e immunoistochimica dopo cytopspin) verranno condotte per confermare la identità delle cellule ottenute in coltura. L'analisi funzionale si baserà sulla capacità delle cellule isolate di indurre la proliferazione di linfociti allogenici, caratteristica distintiva delle cellule dendritiche.

Le cellule dendritiche risospese alla concentrazione di 1x10⁵/100 µl in RPMI 1640 contenente il 5% di siero autologo, 10 mM di Hepes buffer, 100 U/ml di penicillina-streptomina, 0.5 mg/ml di amfotericina B, e glutammina allo 0.03% saranno incubate per 2 ore a 37°C in presenza di Tat o di suoi peptidi o delle combinazioni Tat, Rev, Nef, Gag e/o citochine e successivamente inoculate 2 o più volte a distanza di 2-4 settimane per via endovenosa. Alternativamente, le cellule dendritiche verranno trasdotte con vettori

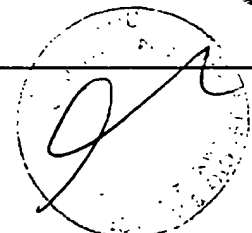
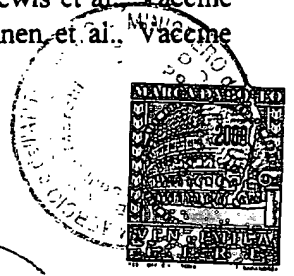
contenenti il gene tat da solo o associato con gli altri vettori summenzionati e successivamente inoculate endovena.

Esempio Profetico 8. Vaccinazione terapeutica

Per stabilire l'efficacia di una vaccinazione terapeutica anti-Tat, sia proteica che a DNA, verranno allestiti esperimenti in scimmie già infettate con SHIV in fase asintomatica e sintomatica. In particolare si valuterà la comparsa di alterazioni nel sito di inoculo e di sintomi generali nelle scimmie asintomatiche e di modificazioni della sintomatologia in animali già sintomatici. Benché remota, esiste infatti la possibilità che in scimmie infette l'inoculazione del Tat aumenti la replicazione virale. Tuttavia, questo effetto dovrebbe essere transitorio in considerazione sia della dose modesta di Tat inoculata, che della breve emivita della proteina transattivatrice (T1/2: 12 h). Nel caso ciò si dovesse verificare impiegheremo i mutanti del Tat (sotto forma di proteine, peptidi o di DNA), descritti nell'esempio 2. Alternativamente utilizzeremo in congiunzione con il vaccino, inibitori della replicazione virale. Per valutare gli effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia, il monitoraggio dei parametri clinici, di laboratorio e viro-immunologici (descritti sopra) verrà effettuato al tempo zero, al momento della successiva somministrazione dell'immunogeno e 30 giorni dopo la stessa. Dopo l'ultima inoculazione il monitoraggio avverrà con frequenza mensile ed ogni qualvolta siano apparsi segni indicanti un repentino cambiamento del quadro clinico. Campioni di PBMC, siero, plasma ed urine verranno congelati ad ogni controllo per successive valutazioni come descritto in precedenza.

Esempio profetico 9. Stimolazione dell'immunità mucosale

Gli immunogeni descritti saranno utilizzati per indurre e/o potenziare una risposta immune specifica a livello delle mucose. Uno degli approcci che verrà utilizzato si basa sull'uso di batteri (*Streptococcus gordonii*, commensale della cavità orale dell'uomo) "ingegnerizzati" ad esprimere gli antigeni virali sopra menzionati. Questi batteri sono in grado di colonizzare la mucosa orale e vaginale nei topi, e di indurre una risposta anticorpale specifica locale e sistemica nei confronti degli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti [Oggioni et al., *Vaccine* 13: 775 (1995); Medaglini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6868 (1995); Medaglini et al., *Vaccine* 1997, in press]. L'inventore ritiene che questo metodo possa essere utilizzato con successo per indurre nelle scimmie *cynomolgus* l'immunizzazione specifica anche per via vaginale. Alternativamente l'immunità mucosale può essere indotta con gli immunogeni proteici descritti sopra, utilizzando altri sistemi di "delivery" batterici e non quali le citofectine ed i liposomi, e le vie di inoculazione che sono in grado di indurre la più efficace risposta immune e protettiva [Lewis et al., *Vaccine* Press. Ed. Robinson, Farrar, Woblin; Humian Press. Totowa, New Jersey (1996); Lehnen et al., *Vaccine Research* 1:319 (1992); Hoenenbang et al., *Infect. Immun.* 62:15 (1994)].



1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI SPA

RM 97 A 000743

RIVENDICAZIONI

1. Vaccino contro l'AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta).
2. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag.
3. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.
4. Vaccino a DNA contro l'AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente molecole o frammenti di DNA codificanti per Tat wild-type o per i mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), dette molecole o frammenti di DNA essendo inseriti nel vettore plasmidico pCV0.
5. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA dei geni nef, rev e gag.
6. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA delle ~~citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.~~
7. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI SPA 

IL-12 e IL-15 per immunizzare cellule dendritiche autologhe indotte ad esprimere gli antigeni corrispondenti.

8. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule dendritiche autologhe trasdotte con vettori eucariotici contenenti dette proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e suoi mutanti e relative combinazioni.

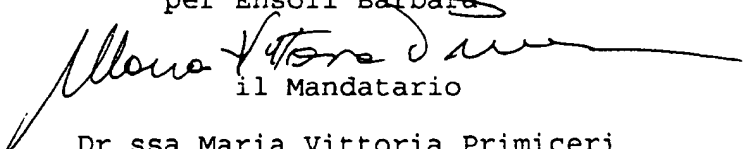
9. Impiego secondo le riv. 7 e 8 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzazione a livello mucosale.

10. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule del sangue periferico tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

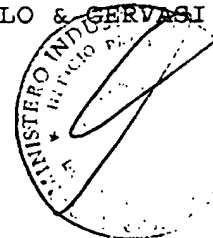
Roma,

/PV

per Ensoli Barbara


il Mandatario

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri
della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

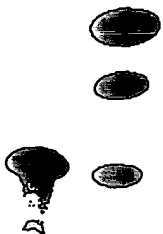


NOTAR BARTOLO & BERVASIS s.p.a.

Me e Vittoria

PM 97 A 0007 43

%AcetII. 0.3 76



TAT
TAT22

○
+
+

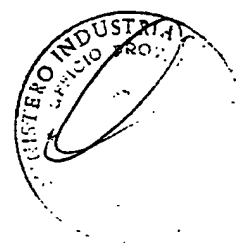
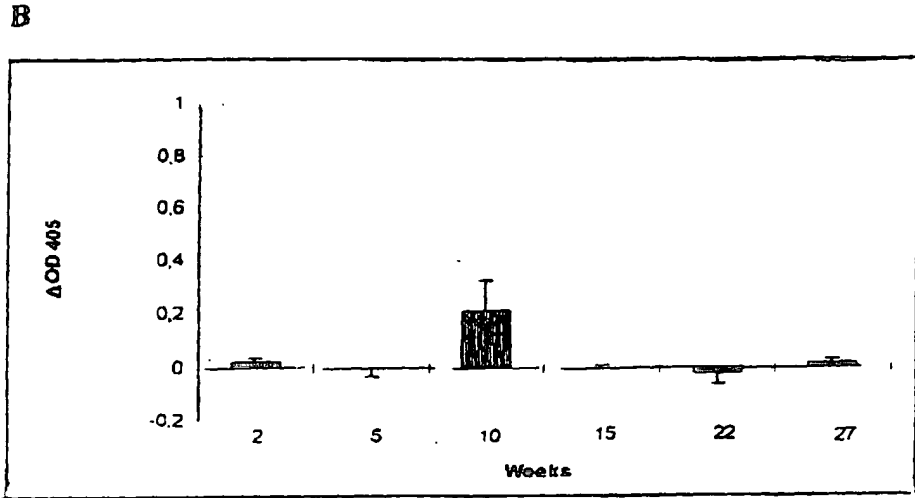
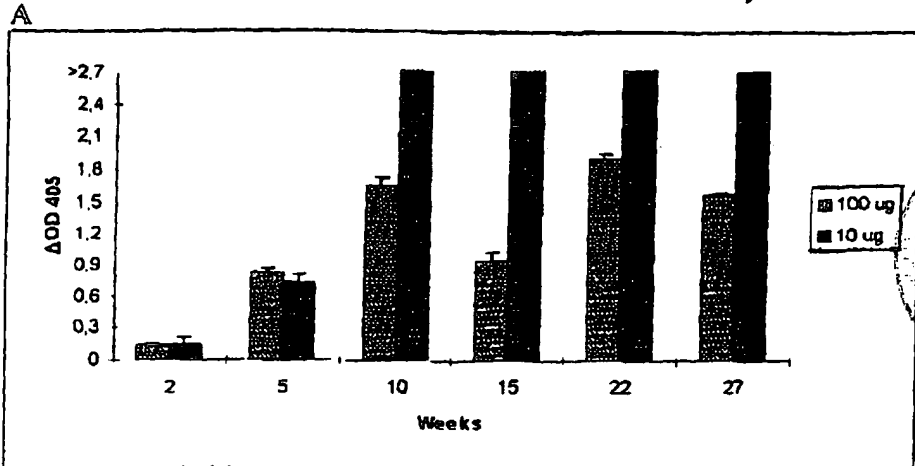


Fig. 1

NOTARIO ARTURO GERVASI S.p.A.
Arturo Gervasi



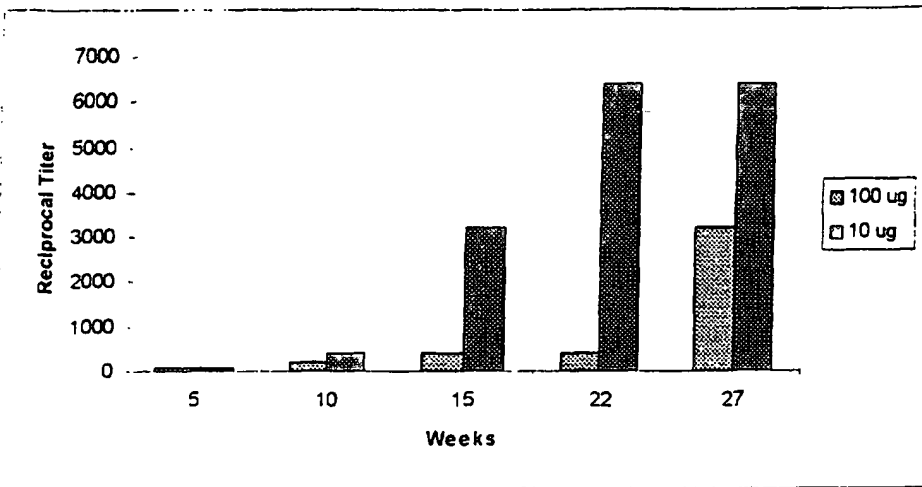
PM 07 A 000743

Fig. 2

0000000000

NOTAR BARTOLO & GERVAISI S.p.A.

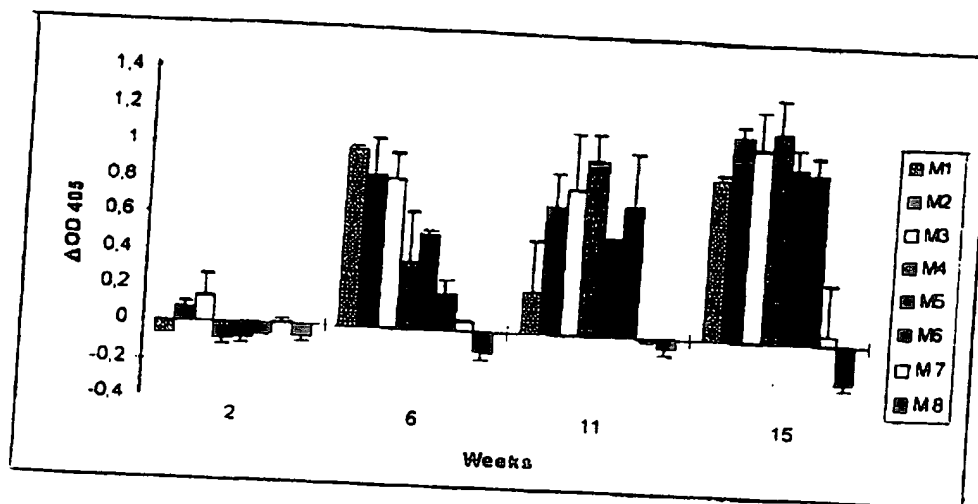
Mano Vito



RM 97 A 000743



Fig. 3



RM 97 A 0007 43

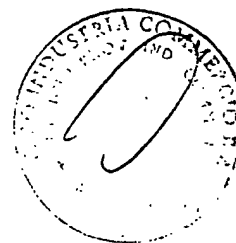
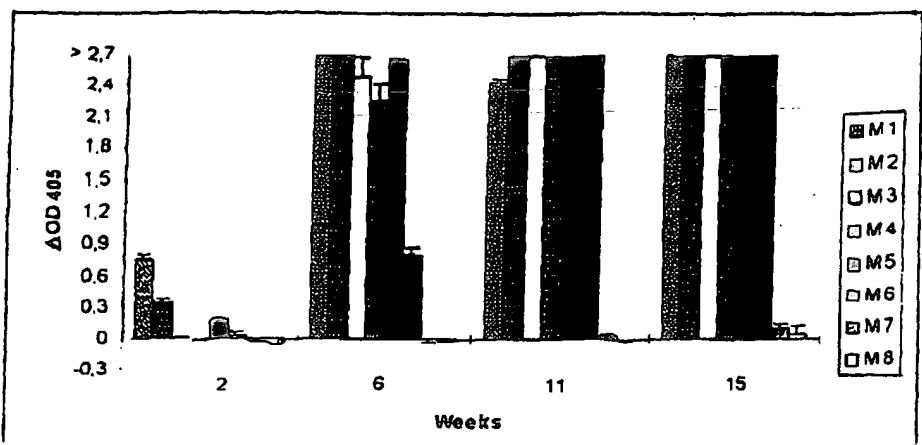


Fig. 4

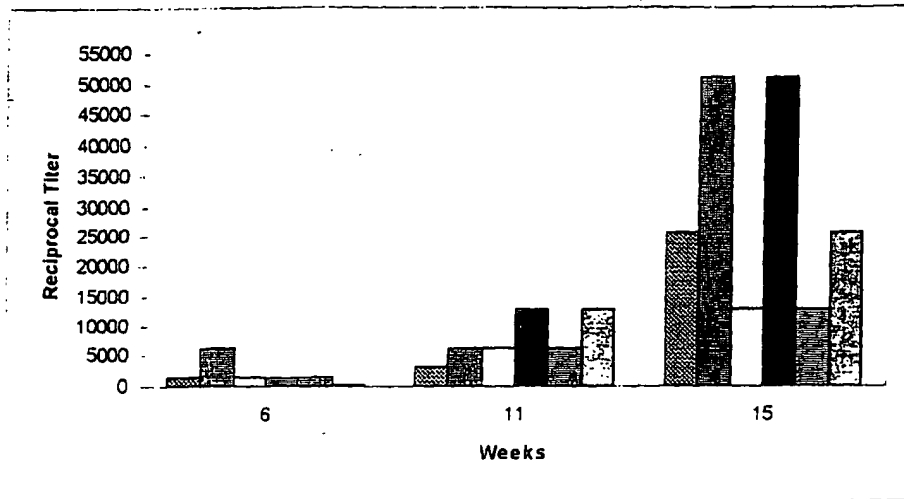
Mano Vitorino



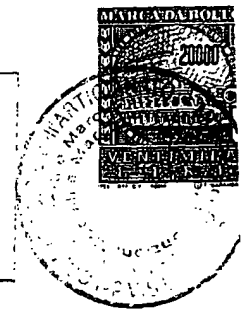
RM 97 A 0007 43



Fig. 5



M1
M2
M3
M4
M5
M6



RM 97 A 000743



Fig. 6

H 02.03.99

NOTA BARTOLO & GERVAISI S.p.A.

[Handwritten signature]

FM 97 A 000743

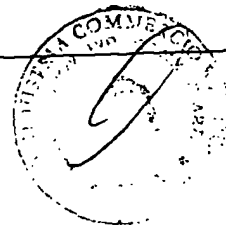
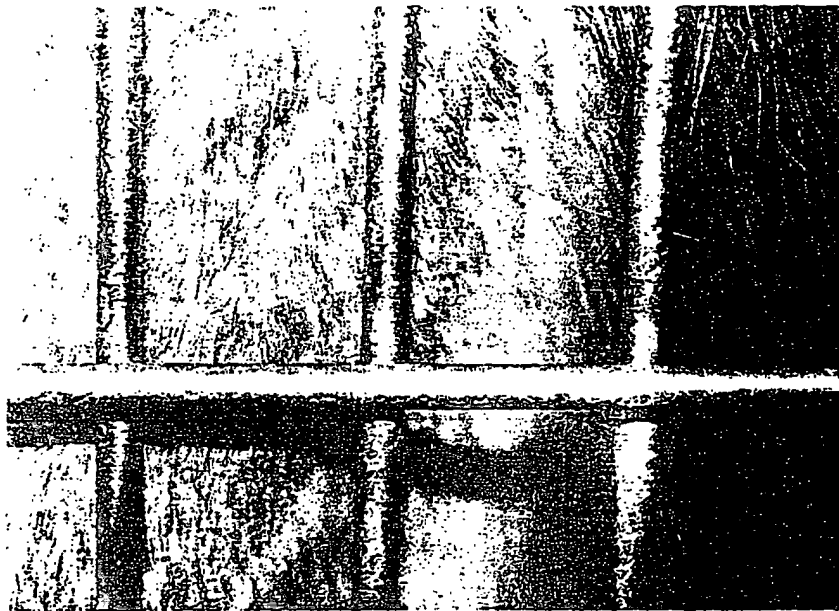


Fig. 7

11 00 00 00

NOTARBARTOLO & GERVAZI S.p.A.

RM 97 A 000743

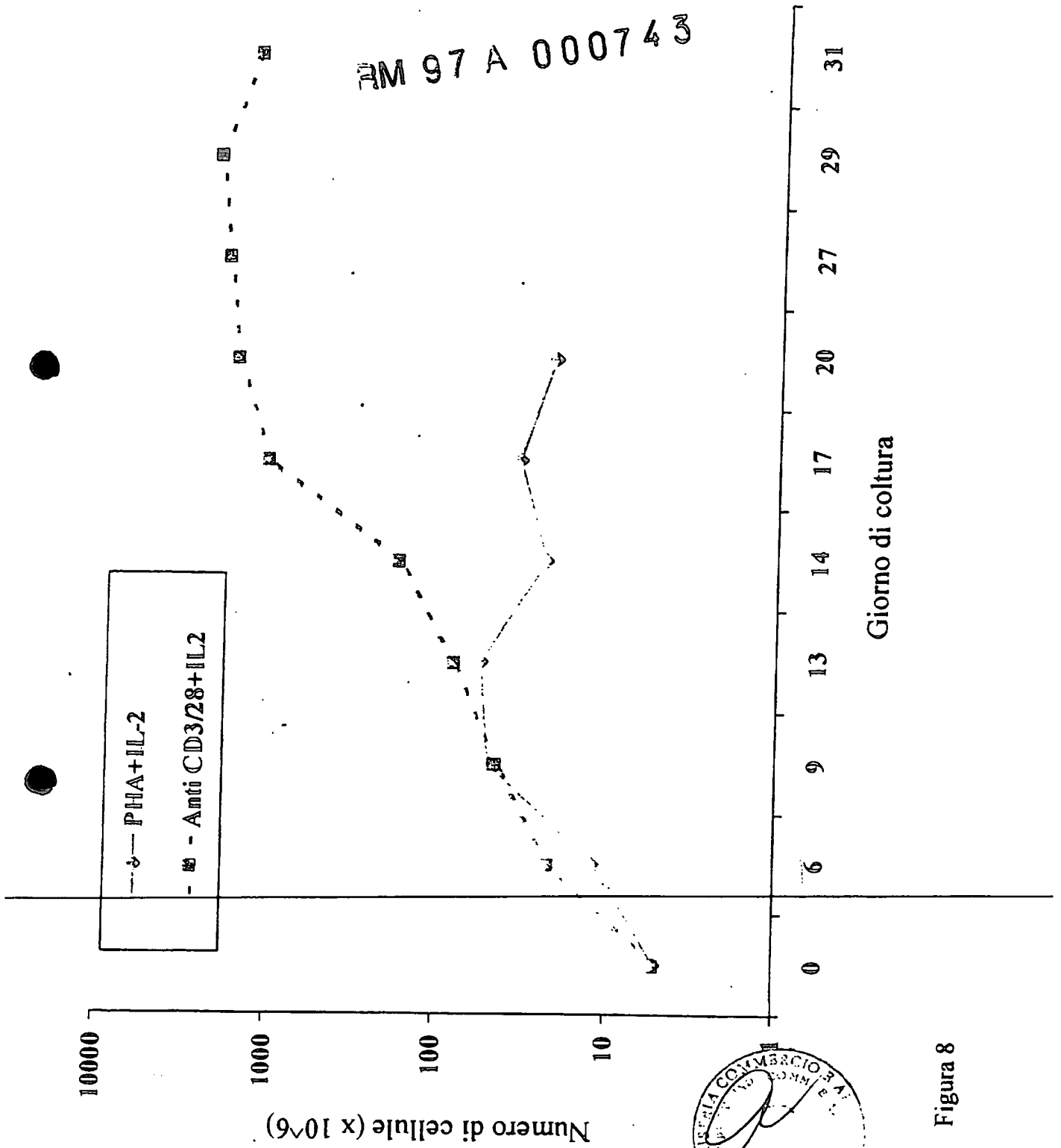
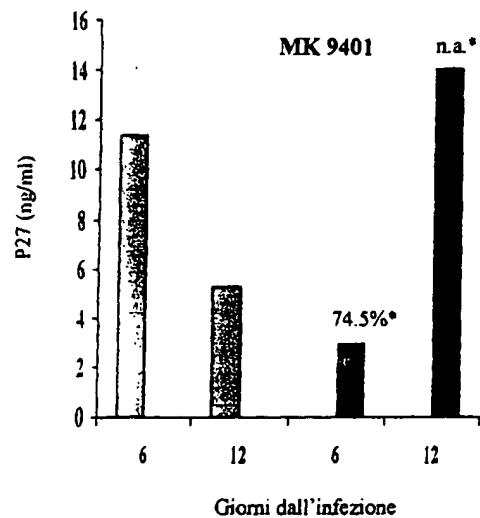
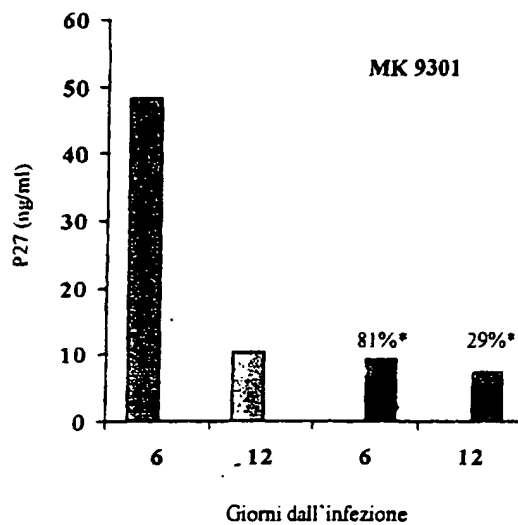
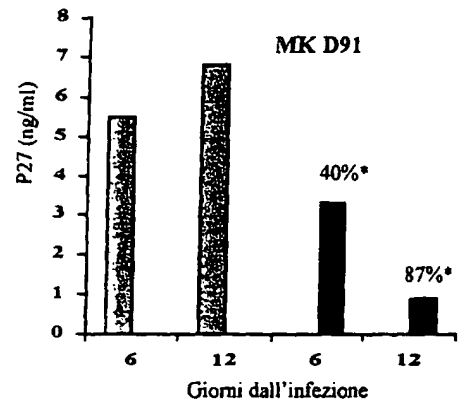
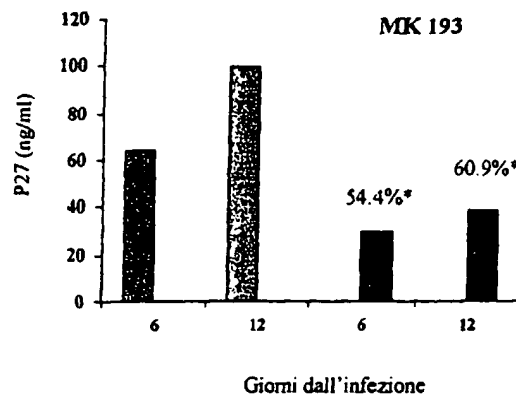


Figura 8

H 00.00.00

NOTA BARTOLO & GERVASI S.p.A.

RM 97 A 000743



PHA+IL-2



Biglie anti-CD3/28 su PBMC CD8-3+28+

*) : Percentuale di inibizione.

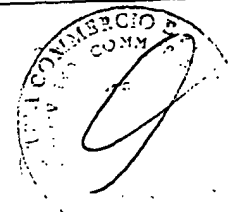


Figura 9

L MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE. ANTICIPATA ACCESSIBILE AL PUBBLICO

RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione Ensofi Barbara

Residenza Via Feste Avieno, 176 - 00136 ROMA

2) Denominazione

Residenza

RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Maria Vittoria Primitoni ed altri

cod fiscale

denominazione studio di appartenenza

via Savoia

n.

città

cap

(prov)

DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

TITOLO

classe proposta (saz/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

beneficiario e beneficiaria, con loro

DATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1)

3)

2)

4)

PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

2)

CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N es

c

PROV

n pag

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

c

PROV

n tav

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

c

RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

c

RIS

designazione inventore

c

RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

c

RIS

autorizzazione o atto di cessione

c

RIS

nominativo completo del richiedente

attestato di versamento, totale lire

obbligatorio

IMPIANTO IL

FIRMA DELL(I) RICHIEDENTE (I)

INTINUA SI/NO

L PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 97 A 000743

codice 58

REALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg A

anno millenovecento

accantuspi

il giorno

del mese di

Dicembre

il richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, costituita di n

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportate

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
L'ufficiale Rogante
Stella Altieri

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

Descrizione della domanda di brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:

"Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate"

A nome di: Barbara Ensoli

con sede in Roma

Inventore designato: Barbara Ensoli

Depositata il con il n.

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, anti-HIV, anti-AIDS e contro i tumori e le sindromi associate all'infezione da HIV che utilizzi proteine, peptidi e DNA (wild-type o mutati) del Tat di HIV, da solo od associato a proteine, peptidi e DNA di altri prodotti virali (Nef, Rev, Gag) o di citochine ad effetto potenziante la risposta immune antivirale. L'invenzione prevede anche la immunizzazione tramite cellule dendritiche autologhe, l'immunizzazione mucosale o l'immunizzazione ex vivo di cellule del sangue periferico espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

Stato dell'arte

L'AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) è causata dal virus HIV e caratterizzata da immunodeficienza, insorgenza di tumori soprattutto il sarcoma di Kaposi (KS) e linfomi a cellule B, infezioni opportunistiche ed alterazioni del sistema nervoso centrale. Poiché l'AIDS è diffusa in tutto il mondo ed ha un'elevata mortalità, uno degli



RM R 0091

obiettivi più importanti di sanità pubblica è lo sviluppo di un vaccino anti-HIV profilattico e/o terapeutico. A tale scopo è stato principalmente utilizzato come immunogeno l'envelope virale o sue subunità, ma i risultati sono stati insoddisfacenti per l'estrema variabilità dell'envelope virale [Wain-Hobson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3:878 (1993); Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NH, 1995)]. Pertanto si ritiene che, in alternativa all'immunità sterilizzante, possa essere sufficiente ottenere il blocco della progressione dell'infezione (vaccino terapeutico). Inoltre, risposte immuni protettive possono essere ottenute utilizzando come immunogeni regioni di DNA dell'agente patogeno [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Boyer et al., Nature Med. 3:526 (1997)]. In considerazione dei dati sperimentali pubblicati, l'inventore ritiene necessario utilizzare un vaccino allestito con prodotti virali diversi da env che siano più conservati tra i vari isolati di HIV, in grado di indurre un'efficace risposta immune sia umorale che cellulare, e che abbiano una funzione vitale per il virus.

Questi debbono essere sperimentati nel modello dei primati non umani in quanto il sistema immune è più simile a quello dell'uomo di quello di

animali filogeneticamente più distanti e nei quali si sviluppa AIDS dopo infezione. La proteina regolatrice Tat di HIV-1 possiede tutti questi requisiti: è conservata, immunogenica ed essenziale per le fasi precoci dell'infezione virale. Inoltre Tat svolge un ruolo fondamentale non solo nella replicazione virale e nella trasmissione e progressione dell'infezione, ma anche come fattore di insorgenza e di progressione

- dei tumori associati all'AIDS, quali il KS che è il tumore più frequente associato all'AIDS, e di altre sindromi e sintomi che insorgono dopo l'infezione da HIV.

Tat è una proteina di 86-102 aminoacidi, a seconda dei ceppi virali codificata da due esoni. Tat è prodotta precocemente dopo l'infezione, si localizza nel nucleo e transattiva l'espressione dei geni virali interagendo con la sequenza bersaglio "Tat-responsive element" (TAR) dell'LTR [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Tat potrebbe anche avere un ruolo nella virulenza di HIV tramite altri meccanismi di azione nel ciclo virale [Huang et al., EMBO J. 13:2886 (1994); Neuve et al., J. Virol. 70:5572 (1996); Harrich et al., EMBO J. 16:6 (1997); Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8116 (1997)]. Il prodotto del primo esone (aminoacidi 1-72) è conservato in diversi isolati virali [Myers et al., Human retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos. (1995)] ed è sufficiente per la transattivazione di HIV-1 [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Esso contiene 4 domini. Il dominio acidico (aminoacidi 1-21) è importante per l'interazione di Tat con proteine cellulari; la regione ricca in cisteine (aminoacidi 22-37) rappresenta il dominio di transattivazione. Questa regione è la più

conservata negli isolati primari [Meyerhans et al., Cell 58:901 (1989)].

La sostituzione della cisteina 22 con una glicina abolisce la capacità di Tat di transattivare l'HIV-LTR [Yang et al., J. Virol. 70:4576 (1996)]; la regione core (aminoacidi 38-48) è anch'essa conservata ed importante per l'attivazione, e la sostituzione della lisina 41 con una treonina inattiva l'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV [Kashanchi et al., J.

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

- Virol. 70:5503 (1996)]; il dominio basico (aminoacidi 49-57), ricco in arginine e lisine, è necessario per la localizzazione nucleare e lega specificamente il suo RNA bersaglio (TAR) [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Inoltre, la regione basica è responsabile del legame del Tat extracellulare all'eparina e agli eparan solfati proteoglicani (HSPG) [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Mutazioni nella regione basica aboliscono queste interazioni. La porzione carbossi-terminale di Tat non è necessaria per la transattivazione dell'LTR, ma contiene una sequenza arginina-glicina-acido aspartico (RGD), normalmente presente nelle proteine della matrice extracellulare (ECM), responsabile del legame di Tat ai recettori integrinici $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ e degli effetti di Tat sui tumori associati all'AIDS e sul sistema immune, vascolare e nervoso [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 149:3727 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Zauli et al., Blood 80:3036 (1996); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2: 189 (1995)]. Durante l'infezione acuta delle cellule T con HIV-1 o dopo transfezione del gene tat in cellule COS-1, la proteina Tat è rilasciata in assenza di morte cellulare nell'ambiente extracellulare [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Il rilascio di Tat dalle cellule infettate avviene anche in vivo poiché Tat è presente nel siero di soggetti infetti [Westendrop et al., Nature 375:497 (1995)] e nelle lesioni AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Dopo il rilascio, una parte della proteina rimane in forma solubile mentre l'altra si lega agli HSPG della ECM. Tat legato agli HSPG può essere recuperato in una forma solubile dall'eparina. Il legame con l'eparina è dovuto alla regione



basica di Tat, previene gli effetti del Tat extracellulare e protegge la proteina dall'ossidazione tanto da averci consentito la purificazione di Tat con alta attività biologica [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Tat extracellulare può essere internalizzato dalle cellule, può migrare nel nucleo e transattivare l'espressione del genoma virale [Frankel et al., Cell 55:1189 (1988); Mann et al., EMBO J. 10:1733 (1991); Marcuzzi et al., J. Virol. 66:4228 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. L'internalizzazione di Tat avviene per endocitosi mediata dal legame dell'RGD all' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7941 (1993) Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)] e/o tramite endocitosi mediata dalla regione basica che si lega agli HSPG.

Tat può attivare la replicazione virale e la diffusione dell'infezione anche tramite meccanismi indiretti che coinvolgono la modulazione dell'espressione di geni cellulari, che hanno un ruolo chiave nel controllo della sopravvivenza cellulare, e di citochine infiammatorie con effetto sulla replicazione virale [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Oltre ad essere essenziale per la replicazione del virus, Tat svolge un ruolo molto importante nella patogenesi dell'AIDS. Tat è in grado di modulare la sopravvivenza e proliferazione di cellule infettate e non infettate determinando l'attivazione o repressione di citochine, quali IL-2 [Puri et al., AIDS Res. 11:31 (1995); Westendorp et al., J. Virol. 68:4177 (1994); Chirmule et al., J. Virol. 69:492 (1995)], o di geni che svolgono un ruolo chiave nel ciclo cellulare [Sharma et al., Biochem. Biophys. Res. Co. 208:704 (1995); Zauli et al., Blood 86:3823 (1995); Li et al.,

1100000000

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

1354PTIT

Science 268:229 (1995); Westendorp et al., Nature 375:497 (1995); Gibellini et al., Blood 89:1654 (1997)]. Gli effetti anti- o pro-apoptotici di Tat dipendono da diversi fattori quali il tipo cellulare, dal fatto che Tat sia espresso dalla cellula o aggiunto alla cellula, e dalla sua concentrazione [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Zauli et al., J. Immunol. 157:2216 (1996)].

Tat è il fattore responsabile dell'aumentata frequenza ed aggressività del KS in soggetti infettati da HIV-1 [Ensoli et al., AIDS Updates, Eds. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Lippincott J.B., Philadelphia: 7: 1 (1994); Corallini et al., Cancer Res. 53: 1 (1993)]. Il KS è un tumore di origine vascolare e la neoplasia più frequente in soggetti infettati dal virus. Tat induce le cellule KS e le cellule endoteliali attivate da citochine infiammatorie (IC) a migrare, esprimere collagenasi IV, invadere la ECM e proliferare, processi necessari per l'angiogenesi e l'invasione tumorale. [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Albini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4838 (1995); Fiorelli et al., J. Clin. Invest. 95:1723 (1995)]. Questi effetti del Tat sono indotti dalle IC, poiché esse stimolano l'espressione dei recettori per Tat, l' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7941 (1993)]. Tat mima l'effetto delle proteine della ECM, quali la fibronectina e la vitronectina e la regione contenente la sequenza RGD e la regione basica sono necessarie per gli effetti del Tat extracellulare sulle cellule KS, sull'angiogenesi e sulla progressione del KS. La dimostrazione della presenza di Tat extracellulare e del suo legame in vivo ai recettori per il Tat nelle lesioni

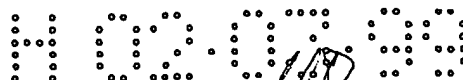
AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 345: 84, 1994] sostiene l'idea che Tat sia coinvolto nell'insorgenza e nel mantenimento del KS associato all'AIDS. Inoltre topi transgenici per il gene tat sviluppano tumori tipo KS o di altro fenotipo a seconda del livello di espressione del transgene [Vogel et al., Nature 335: 601 (1988); Corallini et al., Cancer Res, 53: 5569 (1993)].

○ E' stato suggerito che Tat svolga anche un ruolo nei fenomeni iperproliferativi e nella patogenesi dei linfomi B frequentemente osservati in individui sieropositivi ed in topi-transgenici per tat [Vellutini et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:21 (1995)], tramite meccanismi che coinvolgono l'aumento dell'espressione di bcl-2 e di citochine [Puri et al., Cancer Res., 52:3787 (1992)]. Altre evidenze confermano un possibile ruolo di Tat nell'oncogenesi [Kim et al., Oncogene 7: 1525 (1992)].

○ Tat può anche attivare l'espressione di promotori virali quali quelli degli herpesvirus ed altri virus che si riattivano in soggetti con AIDS favorendo l'insorgenza e la progressione di infezioni opportunistiche [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Il Tat infine, sembra anche esercitare effetti neurotossici sia diretti,

tramite la regione basica e l'RGD, che indiretti tramite l'induzione di citochine infiammatorie ad effetto tossico sui neuroni del sistema nervoso centrale o sulla barriera ematoencefalica [(Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. In soggetti adulti ed in soggetti pediatrici le alterazioni del sistema nervoso centrale possono portare a demenza e ad alterazioni dell'apprendimento e del comportamento, rispettivamente.



Per quanto riguarda la risposta immune al Tat, diversi studi suggeriscono che gli anticorpi anti-Tat hanno un ruolo protettivo e possono controllare l'evoluzione della malattia in vivo [Reiss et al., J. Med Virol. 30:163 (1990); Rodman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7719 (1993); Rodman et al., J. Exp. Med. 175:1247 (1992); Re et al., J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 10:408 (1996)]. Inoltre, in vitro, anticorpi anti-Tat, non solo sopprimono l'internalizzazione, l'attivazione trans-cellulare di Tat e l'infezione [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Re et al., J. Acq. Immun. Def. Syndr. 10:408 (1995)], ma inibiscono anche la proliferazione, la migrazione indotta da Tat di cellule AIDS-KS e la formazione di lesioni simil-KS indotte da nel topo [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Infine, i nostri risultati preliminari indicano che anticorpi anti-Tat sono assenti in soggetti con AIDS-KS suggerendo che questi individui non possiedono attività anticorpali bloccanti il Tat extracellulare e, pertanto, che questa proteina possa agire indisturbata.

Lo sviluppo di una risposta cellulo-mediata anti-Tat nella fase iniziale dell'infezione è importante nel controllo dell'infezione [Voss et al., Virology 208:770 (1995); Rinaldo et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:481

(1995); Harrer et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 12:585 (1996)] ed esiste una correlazione inversa tra la presenza di CTL specifiche anti-Tat e la progressione della malattia [van Baal et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997)]. Simili risultati sono stati ottenuti da studi condotti su macachi inoculati con SIVmac [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)]. Inoltre recenti studi in topi di varia specie in cui il Tat

è stato inoculato sia sotto forma di plasmide che di proteina hanno indicato che è possibile indurre una risposta sia umorale che cellulare verso la proteina [Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)] benché si sia osservata variabilità da specie a specie di topo e questi risultati non siano stati riprodotti con gli stessi immunogeni in uno studio sui primati non umani [Quesada-Rolander et al., ABS 6-S1. 2nd European Conference on Experimental AIDS Research, Stockholm, Sweden, May 31-June 3 (1997)]. La mancanza di riproducibilità della sperimentazione vaccinale nel topo rispetto a quella dei primati non umani è frequente e probabilmente dovuta al sistema immune che è differente nelle due specie animali e che può dar luogo a risposte immuni differenti con lo stesso immunogeno, come evidenziato per l'HIV con la proteina Env del virus. Ciò richiede che gli immunogeni candidati per le sperimentazioni vaccinali per l'uomo siano saggiati nei primati non umani e non solo in specie inferiori.

L'inventore ritiene che altre proteine virali, o loro parti, possano essere associate al Tat e potenziare una risposta immune specifica contro l'HIV, ed essere di beneficio anche per la vaccinazione contro l'insorgenza di tumori e di altre patologie o sintomi associati all'infezione

di HIV. Questi prodotti sono le proteine Nef, Rev e Gag di HIV.

Il Nef è un'altra proteina regolatrice virale importante per lo sviluppo della malattia [(Allan et al., Science 230:813 (1985); Franchini et al., Virology 155:593 (1986); Guy et al., Nature 330:266 (1987)] prodotta precocemente dopo l'infezione e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Nel sistema SIVmac/macaco la presenza di Nef correla con alte dosi di

1354PTIT

carica virale e con la progressione verso l'AIDS [(Kestler et al., Science 248:1109 (1991)). Il Nef è più variabile del Tat [(Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos, NH (1995)). Nef è una proteina immunogenica [(Gobert et al., Virology 176:458 (1990); Choppin et al., J. Immunol. 147:569 (1991); Culman et al., J. Immunol. 146:1560 (1991); Tahtinen et al., Virology 187:156 (1992)], ed è capace di indurre CTL [(Bourgault et al., J. Virol. 66:75 (1992); Couillin et al., J. Exp. Med. 180:1129 (1994)]. In particolare è stata evidenziata una regione immunodominante nella regione centrale di Nef (regione 73-144) che è riconosciuta dalla maggior parte dei pazienti con CTL anti-Nef.

Rev è una proteina regolatrice virale prodotta precocemente durante l'infezione [Gait et al., Trends Biochem. Sci. 18:255 (1993); Parslow, Human Retroviruses, Ed. B.R. Cullen, IRL press, Oxford, England, p. 101 (1993)] e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Rev è essenziale per la replicazione di HIV e la progressione della malattia, ed è codificata da due esoni, parzialmente sovrapposti a quelli codificanti per Tat. Rev è una proteina nucleare [Felber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:1495 (1989)] necessaria per l'espressione degli RNA messaggeri

virali per le proteine tardive [Malim et al., Nature 338:254 (1989)]. Rev è una proteina altamente conservata fra i diversi isolati virali di HIV-1 [Meyers et al., Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM p.1 (1993)] ed è immunogenica. Induce, infatti, la produzione di anticorpi specifici diretti contro i due domini

funzionali della proteina [Pilkington et al., Mol. Immunol. 33:439 (1996)] durante l'infezione naturale nell'uomo [Reiss et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 5:621 (1989)] e dopo inoculazione nel topo [Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)]. La diminuzione dei livelli sierici degli anticorpi anti-Rev sembra correlare con la progressione verso l'AIDS [Reiss et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 5:621 (1989)]. Rev è in grado di indurre CTL sia nell'uomo che nella scimmia [van Baalen et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)] ed è stato riportato che una risposta CTL specifica anti-Rev, precocemente durante l'infezione, correla inversamente con la progressione della malattia [van Baalen et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)].

Un altro bersaglio virale è rappresentato dal gene gag che è espresso tardivamente durante l'infezione e codifica per un gruppo di proteine strutturali del capsido altamente immunogeniche [Bruisten et al., J. Infect. Dis. 166:620 (1992); Sipsas et al., J. Clin. Invest. 99:752 (1997)].

I titoli anticorpali anti-Gag rimangono elevati e stabili nella fase asintomatica dell'infezione, mentre diminuiscono a livelli molto bassi quando l'infezione progredisce ad AIDS conclamato, in concomitanza

con il calo dei linfociti CD4+ e il ritrovamento del virus nel sangue [Baur et al., J. Infect. Dis. 165:419 (1992); Koup et al., J. Virol. 68:4650 (1994)]. Le proteine del Gag inducono attività CTL precocemente durante l'infezione, sia nell'uomo che nei primati [Mcfarland et al., J. Inf. Dis. 170:766 (1994); Yasutomi et al., J. Virol. 70:678 (1996)], e la loro presenza correla significativamente con il controllo della viremia iniziale

e della progressione della malattia [Klein et al., J. Exp. Med. 181:1365 (1995); Aryoshi et al., AIDS 9:555 (1995); Rinaldo et al., J. Virol., 69:5838 (1995); Yang et al., J. Virol. 70:5799 (1996); Lubaki et al., J. Infect. Dis. 175:1360 (1997)]. Infine, le proteine p17 e p24 contengono epitopi immunodominanti che sono conservati tra diversi isolati di HIV-1 e HIV-2 e riconosciuti da CTL [Littau et al., J. Virol. 65:40 (1991); Buseyne et al., J. Virol. 67:694 (1993); Nietfield et al., J. Immunol. 154:2189 (1995); van Baalen et al., J. Gen. Virol., 77:1659 (1996); Nixon et al., Nature 336:484 (1988)].

L'inventore ritiene che citochine, o loro parti, quali l'IL-12 e l'IL-15, o altre citochine ad azione immunomodulante o comunque potenziante l'effetto immunogenico di Tat possano essere utilizzate come adiuvanti nella vaccinazione anti-Tat. L'IL-12 è una potente citochina immunoregolatrice prodotta dalle cellule presentanti l'antigene quali cellule B e dendritiche [Per review vedi Trinchieri, Curr. Opin. Hematol. 4:59 (1997)]. L'IL-12 è prodotta precocemente dopo l'infezione da HIV ed ha azione proinfiammatoria inducendo le cellule NK e i linfociti T a produrre IFN γ che determina l'attivazione dei fagociti e favorisce l'induzione di linfociti Th1. L'IL-12 svolge un ruolo fondamentale

nell'aumentare la resistenza nei confronti di molte infezioni causate da batteri, funghi, virus ed ha un'elevata attività antitumorale. Si pensa che i virus che inducono un'immunodepressione, quali l'HIV e il virus del morbillo, agiscano anche attraverso meccanismi che sopprimono la produzione di IL-12. [Grosjean et al., J. Exp. Med. 186: 801 (1997); Fugier-Vivier et al., J. Exp. Med. 186: 813 (1997) Schnorr et al, Proc.

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A. 

Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5326 (1997)].

L'IL-15 è una citochina pleiotropica espressa dai tessuti non linfoidi, dai monociti/macrofagi attivati e dalle cellule dendritiche [Quinn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:6 (1997); Jonuleit et al., J. Immunol. 158:2610 (1997)]. L'IL-15 svolge un ruolo importante nella regolazione dell'attività NK, della proliferazione dei linfociti T e dell'attività CTL [Jullien et al., J. Immunol. 158:800 (1997); Carson et al., J. Clin. Invest. 99:937 (1997)]. L'IL-15 induce l'espansione dei CTL contro antigeni di HIV, in assenza di IL-2 e linfociti T CD4+ funzionali [Kanai et al., J. Immunol. 157:3681 (1996); Agostini et al., Blood 90:1115 (1997)]. Inoltre, l'IL-15 come l'IL-2, induce la comparsa di linfociti dotati di attività citotossica ("lymphokine-activated killer", LAK) e stimola la produzione di IFN γ nei PBMC di pazienti sieropositivi [Lucey et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:43 (1997)]. L'IL-15 attiva i monociti a produrre chemochine, svolgendo un ruolo di regolazione nell'innescare dei processi infiammatori [Badolato et al., Blood 90:2804 (1997)].

Nell'ambito dei diversi sistemi volti alla generazione di vaccini efficaci antivirali ed antitumorali, l'inventore ritiene che l'utilizzazione di cellule dendritiche possa essere un elemento chiave nell'induzione della

risposta immune al Tat. Ciò è dovuto al fatto che queste sono le cellule più efficienti nel presentare l'antigene e le uniche in grado di stimolare linfociti vergini, in assenza di adiuvanti [Steinman R.M., Exp. Hematol. 24: 859 (1996)]. L'uso di cellule dendritiche sostituisce la funzione di numerosi adiuvanti che consiste nell'indurre una risposta immunitaria non specifica (immunità naturale) che a sua volta in presenza

dell'antigene genera una potente risposta specifica primaria.

Poiche' la trasmissione dell'infezione da HIV avviene prevalentemente a livello mucosale (genitale e rettale nell'adulto, orale nel neonato), l'inventore ritiene che l'induzione di immunita' protettiva a livello mucosale e' un obiettivo di primaria importanza. Numerosi studi hanno recentemente dimostrato la possibilita' di indurre immunizzazione mucosale locale e sistemica. In particolare la via nasale e quella orale si sono dimostrate fra le piu' efficienti nell'indurre una efficace risposta immunitaria mucosale anche in siti distanti, quali le mucose genitali [Rosenthal et al., Seminars in Immunology 9:303 (1997); O'Hagan et al., Novel Delivery Systems for Oral Vaccines, Eds. O'Hagan, D.T. CRC Press Boca Raton, FL, p. 176 (1994)].

Studi recenti hanno dimostrato che la costimolazione di linfociti CD4+ con biglie paramagnetiche ricoperte con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 determina l'espansione logaritmica e policlonale dei linfociti provenienti da soggetti infetti con HIV [Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)] senza attivare la replicazione e la propagazione del virus. Questa attivita' antivirale e' conseguente alla modulazione negativa dell'espressione di CCR5, il corecettore per i ceppi monocitotropi

dell'HIV-1 [Carrol et al, Science. 276: 273-276. (1997)] e, in misura minore agli elevati livelli di chemochine indotti mediante costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 [Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)]. L'inventore ritiene che la possibilita' di espandere linfociti autologhi da soggetti infettati con HIV in assenza di replicazione/propagazione virale consente di approntare un efficace

immunizzazione ex vivo, descritto negli esempi, che può essere di grande utilità nell'allestimento di un vaccino anti-Tat.

L'inventore ritiene che queste osservazioni suggeriscono che l'immunizzazione con Tat da solo o combinato con altri prodotti virali o citochine immunomodulanti, o loro parti, potrebbe bloccare la replicazione virale in soggetti esposti dopo la vaccinazione e in soggetti già infetti, mantenendo l'infezione in uno stadio abortivo che, pertanto, potrebbe essere controllata più facilmente dal sistema immune. Pertanto l'inventore ritiene che un vaccino basato sul Tat dovrebbe essere in grado di indurre una risposta immunitaria, sia umorale che cellulare, sufficiente a bloccare o ridurre la replicazione o la trasmissione del virus e quindi a proteggere dall'infezione, dalla malattia e dall'insorgenza dei tumori e di altre sindromi e sintomi associati all'AIDS. È possibile, quindi, impiegare il vaccino anti-Tat a scopi sia di prevenzione che di terapia. Infatti, una risposta umorale contro Tat potrebbe neutralizzare gli effetti di Tat extracellulare riducendo e limitando l'infezione, e gli effetti del Tat extracellulare, mentre la risposta cellulo-mediata verso Tat e altre proteine virali, incluse nella formulazione vaccinale, dovrebbe distruggere le cellule replicanti il virus e, quindi, contenere l'infezione, e

dare tempo sufficiente al sistema immune dell'ospite di sviluppare una risposta immune completa verso tutte le componenti virali in assenza di danni irreparabili dovuti all'alta replicazione virale.

Rivendicazioni

L'oggetto dell'invenzione riguarda:

1. un vaccino proteico o peptidico da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende proteine ricombinanti del Tat wild-type e dei suoi mutanti (Seq. 1-5), espresse e purificate come descritto, o dei suoi peptidi wild-type o mutanti (Pep. 1-7), che siano somministrati da soli o coniugati con l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper;

2. un vaccino come descritto sopra, combinato con proteine ricombinanti o peptidi di Nef, Rev o Gag di HIV, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag o parte delle stesse;

3. un vaccino come descritto sopra, in combinazione con proteine ricombinanti di citochine immunomodulatorie, quali IL-12, IL-15 od altre molecole, o parti delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/IL12, Tat/IL-15 o Tat/altre molecole, o parte delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale;

4. un vaccino a DNA da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende vettori che codificano Tat wild-type o i suoi

mutanti (Seq. 1-5), o parti di essi, inseriti nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori;

5. un vaccino a DNA come descritto al punto 4, in combinazione con molecole di DNA, inserite nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori, dei geni rev, nef e gag di HIV, o parte degli stessi, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/rev, tat/nef.



tat/gag o parte degli stessi;

6. un vaccino a DNA come descritto sopra, in combinazione con molecole a DNA, basate sul plasmide pCV0 o altri vettori, dei geni per le citochine immunomodulatrici IL-12, IL-15 o altri geni immunomodulatori, o parte degli stessi, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/IL-12, tat/IL-15 o tat/altre molecole, o loro parti, in grado di potenziare la risposta immune antivirale;

☐ 7. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA da solo o combinato come sopra, descritto per l'immunizzazione con cellule dendritiche autologhe mediante trattamento ex vivo;

8. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto per l'immunizzazione mucosale (nasale, orale, vaginale o rettale);

9. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto, per l'immunizzazione ex vivo di cellule dal sangue periferico di soggetti infettati che siano espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 ed anti-CD28 e reinfuse nell'ospite.

10. un vaccino terapeutico anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, come descritto, combinato con inibitori della replicazione virale.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, contro l'infezione da HIV, la progressione verso l'AIDS, lo sviluppo di tumori e di altre sindromi e sintomi insorgenti in soggetti infettati dal

virus, che utilizzi molecole ricombinanti, proteiche, peptidiche e a DNA di Tat di HIV. Più in particolare, l'invenzione concerne un vaccino basato su Tat di HIV-1 come immunogeno, inoculato sotto forma di DNA e/o di proteina ricombinante o di peptidi, da solo o in combinazione con altri geni o prodotti genici virali (Nef, Rev, Gag) o parti di esse, oppure in combinazione con diverse citochine immunomodulatrici (IL-12, IL-15) o il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di esse. Tat, Nef, Rev, Gag e le citochine immunomodulatrici sono somministrati sia sotto forma di una miscela di proteine ricombinanti, di peptidi o di proteine di fusione (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) che di DNA plasmidici. E' inoltre descritto un metodo di immunizzazione che utilizza cellule dendritiche autologhe trattate ex vivo con la proteina Tat ricombinante, o suoi peptidi, da sola, o con una miscela di proteine ricombinanti o peptidi (Tat, Nef, Rev, Gag) o con la proteina Tat e una o più citochine immunomodulatrici, o parti delle stesse, oppure trasdotte con vettori eucariotici contenenti Tat da solo, o con geni virali codificanti per Nef, Gag o Rev, oppure Tat e il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di essi. E' ~~anche descritto l'uso per l'induzione di una risposta immune a livello~~ mucosale. Il Tat, o suoi peptidi, da sola o in combinazione con con proteine virali e/o citochine è inoculata anche a livello mucosale per potenziare ed indurre la risposta immunitaria locale. La proteina Tat dell'HIV, o sue subunità, sarà anche utilizzata per immunizzare ex vivo linfociti CD4+ e CD8+ isolati dal sangue periferico di soggetti infetti. Successivamente, le cellule specifiche per l'antigene Tat saranno

espanse in vitro mediante costimolazione con anticorpi monoclonali diretti contro il CD3 ed il CD28 e reinfuse. E' infine descritto l'uso di mutanti di Tat, identificati negli esempi, da utilizzare come immunogeni in alternativa a Tat wild type. I mutanti di Tat sono i) nella regione cisteinica (cys22) e ii) nella regione del core (lys41), iii) il mutante deleta della sequenza RGD; iv) il doppio mutante nella lisina 41 e nell'RGD. In alternativa all'uso di mutanti di Tat o peptidi di Tat (wild type o mutati in maniera analoga alla proteina) in caso di vaccinazione terapeutica si utilizzeranno, in congiunzione con l'immunogeno, inibitori della replicazione virale.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi specifici, illustrativi, ma non limitativi, in cui si farà riferimento alle seguenti figure.

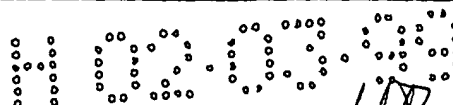
Breve descrizione delle figure:

FIGURA 1. Test di CAT per determinare la capacità della proteina Tat-cys22 (Tat22) purificata di competere con l'attività transattivante della proteina Tat wild type. Cellule H3T1, contenenti integrato nel proprio genoma il vettore "reporter" HIV-1 LTR-CAT [Sodroski et al., Science 227:171, (1985)], in cui il gene per l'enzima cloramfenicolo acetil transferasi (CAT) è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore

LTR di HIV-1, sono state incubate in presenza della proteina Tat wild type (100 ng) da sola o in combinazione con un eccesso molare di proteina Tat-cys22 (1 µg). L'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV-1 e la capacità della proteina Tat-cys22 di competere con Tat wild type, sono state determinate dopo 48 ore, sottoponendo aliquote degli estratti citoplasmatici (corrispondenti a 200 µg di proteine) al saggio per la

determinazione dell'attività dell'enzima CAT, come descritto [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Sono indicate le percentuali (%) di acetilazione del ^{14}C -cloramfenicolo.

FIGURA 2 . Risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie vaccinate con la proteina Tat, determinata mediante saggi immunoenzimatici (ELISA). (A) riporta i risultati ottenuti su due scimmie inoculate con 10 o con 100 μg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μl di siero autologo e 250 μl di RIBI, per via sottocutanea in un sito; (B) riporta i risultati relativi alla scimmia di controllo non inoculata. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. La presenza della risposta anticorpale anti-Tat nei plasmi degli animali vaccinati veniva valutata mediante ELISA da noi allestiti e caratterizzati. La proteina Tat, era adsorbita ai pozzetti di piastre da 96 di PVC (100 ng/pozzetto in 200 μl di tampone carbonato 0.05 M pH 9.6) per 12 ore a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS-A 1x contenente Tween 20 (0.05%), si aggiungevano i sieri (in doppio) diluiti 1:50 in 200 μl di tampone carbonato, si incubava a 37°C per 90', si lavavano i pozzetti con PBS-A 1x/Tween 0.05% e si evidenziava la presenza degli immunocomplessi mediante l'aggiunta di 100 μl di anticorpo secondario (diluito 1:1000 in PBS-A 1x/Tween 0.1%/BSA 1%) coniugato con perossidasi di rafano, per 90' a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi dei pozzetti, si aggiungevano 100 μl di substrato della perossidasi (ABTS 1 mM, Amersham) per 30-45' a temperatura ambiente e quindi si procedeva alla lettura spettrofotometrica a 405 nm. Ogni saggio ELISA



includeva un siero policlonale di coniglio anti-Tat (controllo positivo) diluito da 1:200 a 1:6400, e i sieri delle scimmie prelevati al tempo 0 (controllo negativo) diluiti 1:50. Il valore di cut off è stato considerato come la media (\pm S.D.) delle letture dei sieri di tutte le scimmie, prelevati al tempo 0, ottenute in tutti gli esperimenti. I risultati riportati nell'istogramma relativi a ciascun campione corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture dei due pozzetti, sottratti del valore del cut off \pm S.D (Δ OD405). $>2,7$: i valori di lettura erano fuori scala.

FIGURA 3. Titolazione dei plasmi delle scimmie inoculate con 100 e 10 μ g di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2. I risultati in ordinata sono rappresentati come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 4. Analisi della risposta umorale anti-Tat specifica di tipo IgM in scimmie inoculate con Tat e determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate sottocute con 10 μ g di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate sottocute con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; 2 scimmie di

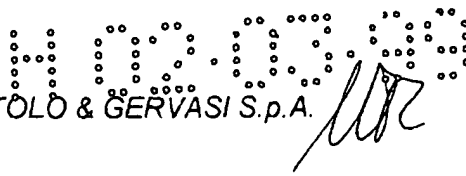
controllo inoculate sottocute con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M7) e con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. In questo caso i sieri degli animali erano saggiati (in

doppio) alla diluizione 1:100 e veniva utilizzato come anticorpo secondario un siero di capra anti-IgM di scimmia coniugato con perossidasi di rafano e diluito 1:1000.

FIGURA 5. Analisi della risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie inoculate con Tat determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate con 10 µg di Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate con 10 µg di Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum; due scimmie di controllo inoculate con RIBI (250 µl e 250 µl di siero autologo) (M7) o con Alum (250 µl e 250 µl di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. >2,7: il valore era fuori scala.

FIGURA 6. Titolazione dei sieri delle scimmie inoculate con la Tat ricombinante (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). I risultati sono rappresentati per ciascun siero come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

~~**FIGURA 7.** Analisi della risposta di ipersensibilità ritardata a Tat~~ mediante esecuzione dello skin test. La proteina Tat (5, 1 e 0.2 µg), risospesa in 150 µl di PBS contenente lo 0.1% di BSA e il tampone in cui è risospesa Tat, erano inoculati intradermicamente in un'area tricotomizzata del dorso dell'animale. L'area trattata veniva fotografata al tempo 0 e dopo 24, 48 e 72 ore. Le scimmie di controllo erano



inoculate solo con il tampone. Nella figura e' riportato un esempio relativo alla 15^a settimana della scimmia M2 a 48 ore dopo l'inoculazione degli immunogeni. E' evidente una forte reazione positiva a Tat.

FIGURA 8. Cinetica della risposta proliferativa di PBMC di *Macaca fascicularis* alla costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 su biglie paramagnetiche (biglie anti-CD3/28). I PBMC isolati dal sangue periferico erano depleti della sottopopolazione CD8 positiva tramite l'impiego di metodiche immunomagnetiche. Successivamente, parte dei linfociti CD8-depleti veniva stimolata con PHA e IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 3; la parte rimanente veniva fatta aderire alle biglie recanti gli anticorpi anti-CD3/28 ottenendo un popolazione di linfociti CD8-depleti e CD3/28 positivi. A questa frazione veniva addizionata IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 10 di coltura. Le cellule erano contate e la loro vitalità determinata ogni 2-3 giorni. Il rapporto biglie : cellule veniva mantenuto costante. E' riportato il numero di cellule nel tempo.

FIGURA 9. Effetto antivirale della costimolazione con biglie anti-CD3/28 su PBMC di *Macaca fascicularis*. I linfociti CD8-depleti e CD8-depleti CD3+/CD28+, ottenuti con le metodiche descritte nella figura 8 da 4

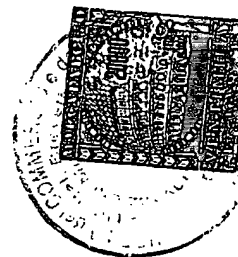
scimmie, venivano stimolati come descritto nell'esempio 5. Le due frazioni erano infettate *in vitro* al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIVmac251/63M. La stimolazione veniva effettuata con PHA e IL-2 aggiunta dal giorno 3, e con le biglie anti-CD3/28 senza aggiunta di IL-2 esogena. La produzione virale veniva valutata determinando i livelli di p27 (ng/ml) sui sovranatanti delle colture al giorno 6 e 12 dall'infezione,

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

come descritto nell'esempio 5.

Esempio 1. Espressione, purificazione e caratterizzazione della proteina Tat (isolato IIIB), proteine mutanti del Tat e peptidi wild type e mutanti di Tat.



Notevoli difficoltà sono state incontrate in passato per la purificazione ed il mantenimento dell'attività biologica della proteina Tat a causa della facilità con la quale si ossida, si aggrega e perde attività. Ciò è dovuto all'alto contenuto in cisteine che formano legami intra- ed inter-molecolari modificando la conformazione della proteina nativa [Viscidi et al., Science 246:1606 (1989); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Il cDNA del gene tat (Seq. 1, esempio 2), che è stato clonato nel vettore pL-syn fornitoci dai Dr. J. F. DeLamarter e B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S.A., Ginevra, Svizzera), è stato usato per l'espressione della proteina in E.Coli.

Un primo procedimento che abbiamo utilizzato e che ha portato all'ottenimento di una proteina attiva, prevedeva passaggi successivi di cromatografia liquida ad alta pressione e cromatografia a scambio ionico [Bohan et al., Gene Expr. 2:391 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. La proteina così ottenuta è pura per oltre il 95% ed attiva [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)], tuttavia non si otteneva una buona riproducibilità da lotto a lotto, dovuta all'ossidazione della proteina, che rappresenta il problema principale con le preparazioni di Tat commerciali. In seguito alla nostra osservazione che la regione basica del Tat ha una forte affinità per l'eparina e che l'eparina ne impedisce l'ossidazione, abbiamo usato la

cromatografia d'affinità con eparina e definito un nuovo protocollo di purificazione di Tat, come descritto da Chang et al., [AIDS 11: 1421 (1997)]. Cellule (10 gr. di peso) di *E.coli* esprimenti Tat erano sonicate in 40 ml di tampone di lisi (fosfato disodico 20mM, pH 7.8; glicerolo al 2.5%; PMSF 0.2 mM; DTT 5 mM; mannitolo 50 mM; acido ascorbico 10 mM; NaCl 500 mM) usando un Ultrasonic Liquid Processor (Modello XL2020, Heat System Inc) con tre scariche di 20 secondi ciascuna. Il lisato era centrifugato a 12,000 g per 30 minuti ed il sovranatante incubato per un'ora a temperatura ambiente con 2 ml di resina eparina sefarosio, pre-lavata con il tampone di lisi. La resina era caricata su una colonna di vetro e lavata con tampone di lisi fino a quando non era più misurata la proteina nel liquido di lavaggio. Il materiale legato era eluito con tampone di lisi contenente 2M NaCl e l'eluato raccolto in frazioni da 1 ml. L'omogeneità della proteina eluita era analizzata tramite elettroforesi su gel (SDS-PAGE). La proteina purificata era conservata liofilizzata a -70°C e risospesa in tampone degassato prima dell'uso.

L'attività biologica della proteina Tat purificata, secondo il protocollo appena descritto, era valutata con un saggio di "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1, che derivano da cellule HeLa-CD4+ contenenti

provirus difettivi nel gene tat, ottenute e descritte da Sadaie et al. [New Biol. 2:479 (1990)]. Il saggio di "rescue" dell'infezione virale, descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], consisteva nel complementare la mancanza di espressione di Tat nelle cellule HLM-1 (2×10^5) mediante l'aggiunta di proteina Tat esogena (2 µg/ml) e valutando la replicazione virale tramite la determinazione, con un kit ELISA di "antigen capture"

commerciale, della concentrazione dell'antigene p24 rilasciato nel terreno di coltura 48 ore dopo l'aggiunta della proteina Tat esogena. I risultati degli esperimenti di "rescue", descritti da Chang et al. [AIDS 11: 1421 (1997)], dimostrano che la proteina Tat, purificata tramite questa procedura era attiva e che questa procedura di purificazione era superiore, più semplice e meno costosa, sia per la purezza che per la sua attività biologica rispetto a quella descritta in precedenza [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)].

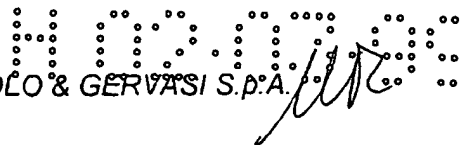
Diverse preparazioni di Tat ricombinante purificato come appena descritto sono state inoculate in presenza di adiuvante di Freund in topi e conigli, secondo protocolli standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. I risultati relativi alla risposta anticorpale indotta dall'immunizzazione sono riportati in Tabella 1.

TABELLA 1.

Analisi della risposta anticorpale specifica anti-Tat nei sieri di topi e conigli immunizzati con la proteina Tat ricombinante.^a

Anticorpo	OD-ELISA/Tat			Western blot
	1:500	1:1000	1:2000	
anti-Tat				
Coniglio	0.651	0.400	0.175	+
Topo	0.502	0.240	0.150	+

^aLa proteina Tat ricombinante prodotta in *E.coli* è stata utilizzata per

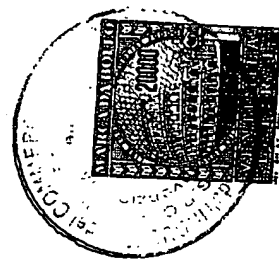


immunizzare topi e conigli secondo protocolli di immunizzazione standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). I sieri degli animali immunizzati sono stati analizzati mediante saggio ELISA per la presenza di anticorpi anti-Tat utilizzando tre diluizioni del siero (1:500 a 1:2000). I risultati riportati rappresentano la media delle letture a 405 nm di due conigli e tre topi. I sieri sono stati inoltre saggiati mediante Western blot sulla proteina Tat ricombinante (100 ng) migrata in gel SDS-poliacrilamide.

I risultati della Tabella 1 dimostrano che Tat ricombinante da noi prodotta era in grado di indurre una risposta anticorpale in ambedue le specie di animali, come saggiato mediante ELISA e Western blot, utilizzando come antigene la proteina Tat ricombinante. Questi anticorpi erano in grado di inibire l'internalizzazione e le attività biologiche del Tat [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol. 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)]. Il vettore pL-syn ed il protocollo di purificazione della proteina Tat sono impiegati per esprimere e purificare i mutanti di Tat descritti nell'Esempio 2. L'attività biologica delle proteine Tat mutate purificate è misurata tramite saggi di "rescue" dell'infezione virale in

cellule HLM-1, saggi di proliferazione cellulare in cellule di KS ed in vivo nel topo, come descritto sopra per la proteina Tat wild-type. Inoltre, le proteine Tat mutate sono saggiate in presenza di Tat wild-type (a concentrazioni seriali) per verificare l'effetto transdominante negativo sulla replicazione virale in saggi di "rescue" in cellule HLM-1. Il vettore pL-syn e il protocollo di purificazione sono impiegati per esprimere e purificare proteine di fusione così composte: Tat (wild type o i suoi

mutanti)/IL-12 o Tat (wild type o i suoi mutanti)/IL-15 o parti delle stesse oppure Tat (wild type o suoi mutanti)/altre molecole (o parte delle stesse) che si dimostrino in grado di potenziare la risposta immune al Tat da solo od associato ad altri prodotti virali. Le molecole ricombinanti di fusione sono costruite utilizzando le sequenze e i primers descritti negli esempi 2 e 3. Alternativamente come immunogeni sono utilizzati peptidi sintetici corrispondenti a regioni di Tat o di altri prodotti virali o di citochine da usare in combinazione con Tat. Le sequenze peptidiche di



Tat sono le seguenti:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

Peptidi mutati di Tat conterranno le stesse sostituzioni aminoacidiche delle proteine Tat mutate descritte nell'esempio 2. I peptidi saranno

utilizzati in combinazione con il peptide rappresentante l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper [Lanzavecchia, Science 260: 937 (1993)].

Esempio 2. Costruzione e caratterizzazione dei mutanti del gene tat

Abbiamo prodotto 19 mutanti in diverse regioni di Tat, mediante mutagenesi sito specifica o per delezione. La sequenza di ciascun DNA mutato è stata controllata mediante sequenziamento. I cDNA del gene

tat mutati sono stati clonati nel sito PstI del vettore pCV0, descritto nell'Esempio 3. Ciascun mutante è stato cotrasfettato, come descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], in cellule COS-1, o nella linea di linfociti T Jurkat, con il plasmide HIV-1 LTR-CAT, in cui il gene reporter CAT è posto sotto il controllo trascrizionale dell'LTR di HIV-1. I risultati di questi esperimenti non sono pubblicati e sono riportati in Tabella 2.

TABELLA 2.

*Effetto dei mutanti di Tat sulla transattivazione dell'HIV-1 LTR-CAT ed
effetto di blocco (transdominante negativo) sull'attività di Tat wild-type*

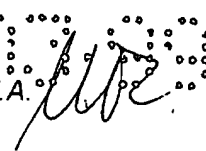
MUTANTI	Attività transattivante ^a		Attività transdominante ^b
	Media (fold)	(valori min-max)	(% inibizione)
CYS 22	0.09	(.021-.22)	21
THR 23	0.36	(.16-1)	
THR 23A	0.30	(.16-.78)	
ASN 24	0.34	(.34-.82)	
ASN 24A	0.42	(.45-.95)	
TYR 26	0.14	(.08-.19)	
LYS 28/29	0.52	(.19-1.04)	
CYS 30	0.30	(.045-.65)	
CYS 31	0.60	(.27-1.09)	
PHE 32	0.31	(.077-.097)	
LYS 33	0.04	(.0027-.068)	46
GLU 35	0.31	(.19-.43)	
PHE 38	0.05	(.043-.057)	98
LYS 41	0.04	(.025-.061)	97
TYR 47	0.58	(.31-.8)	
57 A	0.35	(.26-.44)	
TAT-RGD	0.94	(.73-1.15)	
TAT-KGE	1.11	(.67-1.49)	
TAT wild-type	1	1	

a) I risultati sono riportati come incrementi di attivazione relativi ai valori di attività CAT indotti dal Tat wild-type (Fold = 1). b) I risultati sono espressi in percentuale (%) di inibizione dell'attività del Tat wild type.

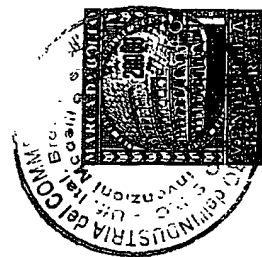
Dai risultati presentati in Tabella 2 si osserva che per la maggior parte dei mutanti l'effetto transattivante l'LTR di HIV-1 era molto ridotto o assente, ad eccezione del mutante per delezione della sequenza RGD che aveva attività paragonabile al Tat wild-type. Abbiamo scelto i 4 mutanti (cys22, lys33, phe38, lys41) con la più bassa attività transattivante (quasi nulla), e ne abbiamo determinato l'effetto transdominante negativo sull'attività transattivante di Tat wild-type. A questo scopo cellule COS-1 erano co-trasfettate con ciascun vettore contenente un mutante di Tat ed il vettore pCV-Tat (nel rapporto molare di 10:1) in presenza del vettore HIV-1 LTR-CAT. Come si osserva in Tabella 2, i mutanti lys41 e tyr47 inibivano pressoché completamente l'attività di Tat, mentre i mutanti lys33 e cys22 inibivano parzialmente l'attività di Tat. Tuttavia, la proteina ricombinante cys22 (descritta nel successivo Esempio 3) era in grado di competere con la proteina Tat wild-type nel transattivare l'HIV-1 LTR-CAT (figura 1). Sono stati scelti

un mutante nella regione cisteinica (cys22), uno nella regione core (lys41), uno nel secondo esone di Tat debole della sequenza RGD (RGDΔ) ed un doppio mutante contenente la mutazione nella lys41 e la delezione della sequenza RGD (lys41-RGDΔ).

La sequenza dell'inserto tat e dei mutanti selezionati per la vaccinazione è riportata qui di seguito. E' descritta una serie di mutanti

H.D.O. 1990


nel gene tat che sono stati preparati per 1) sostituzione di una base per dar luogo ad una sostituzione aminoacidica e 2) delezione di una sequenza di basi per dar luogo ad una delezione dei corrispondenti aminoacidi. Le sostituzioni e delezioni delle basi sono state ottenute per mutagenesi sito-diretta. Le sequenze del gene tat wild-type e dei mutanti del gene tat, riportate qui di seguito sono state inserite nel vettore plasmidico pCV0 come descritto in precedenza.



Per Seq. 1 si intende la sequenza del gene tat di HIV-1, clone BH-10 e della sua proteina derivata. Per Seq. 2 si intende la sequenza del mutante cys22 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 66 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Guanina (G). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Cisteina (C in codice ad una lettera) in posizione 22 dall'estremità amino-terminale, con una Glicina (G in codice ad una lettera). Per Seq. 3 si intende la sequenza del mutante lys41 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 123 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Citosina

(C). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Lisina (K in codice ad una lettera) in posizione 41 dall'estremità amino-terminale, con una Treonina (T in codice ad una lettera). Per Seq. 4 si intende la sequenza del mutante RGD (e della sua proteina derivata), rappresentata dalla delezione della sequenza nucleotidica CGAGGGGAC, che va dal nucleotide 232 al nucleotide 240, a partire dall'estremità 5' della sequenza del gene tat

wild-type. Tale delezione origina, nella sequenza aminoacidica derivata, una delezione degli aminoacidi Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD nel codice ad una lettera) nelle posizioni 78-80 a partire dall'estremità amino-terminale. Per Seq. 5 si intende la sequenza del doppio mutante lys41-RGD Δ (e della sua proteina derivata), un originato dalla combinazione dei mutanti sopradescritti.

Sequenza nucleotidica di tat wild-type (Seq. 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCC
TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC
AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATC
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG 3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTG
CTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCT
ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCA
GTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCC
CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3

Sequenza aminoacidica

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A. 

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA

LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKE-

CaOH

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAGCCCTTAGGCATCTCC
TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC
AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante RGD Δ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCC
TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC

AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC
CCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGD Δ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCC
TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC
AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC
CCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

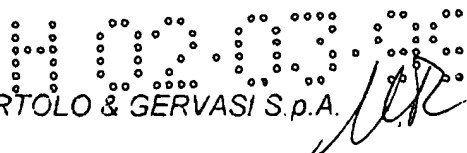
Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Esempio 3. Costruzione e caratterizzazione degli immunogeni a DNA.

Le molecole di DNA per l'inoculazione degli animali sono costruite nel vettore plasmidico pCV0 di 6.4 kb [Arya et al., Science 229:69 (1985)]. Questo plasmide comprende due origini di replicazione di SV40, il "major late promoter dell'adenovirus" (AdMLP), e le sequenze di splicing dell'adenovirus e dei geni delle immunoglobuline di topo, il cDNA del gene della diidrofollato-reduttasi di topo (dhfr) e il segnale di poliadenilazione di SV40. Il sito per l'enzima di restrizione PstI è

localizzato a 3' dell'AdMLP, e rappresenta il sito in cui è clonato il gene esogeno di interesse. Il cDNA del gene tat (261 copp e di basi) (Seq. 1, esempio 2) di HIV era derivato dal ceppo BH10 [Ratner et al., Nature 313:277 (1985)] e codifica una proteina di 86 aminoacidi. Il vettore pCV-Tat [Arya et al., Science 229:69 (1985)] era ottenuto clonando nel sito PstI di pCV0 il cDNA del gene tat, che pertanto era posto sotto il controllo trascrizionale dell'AdMLP. La scelta di questo vettore si basa



sul fatto che l'AdMLP induceva una più elevata espressione e rilascio di Tat, rispetto ad altri promotori eucariotici, come, per esempio, "l'immediate early region promoter" del citomegalovirus (CMV) come dimostrato da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], e riportato nella Tabella 3.

TABELLA 3.

Espressione, localizzazione subcellulare, rilascio ed attività di Tat in cellule COS-1 transfettate con pCV-Tat e CMV-Tat^a.

Vettori Espressione di Tat Contenuto di Tat^b.....Attività di Tat

Cellule Nucleo^c Citoplasma^c Totale Intracell Extracell Intracell^d Extracell.^e

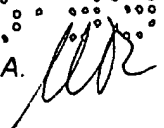
	Positive (%)			Contenuto di Tat ^b (%)		Attività di Tat (%)			
						(fold)	(cpm)		
pCV-Tat	5-10	++	++	25	63.5	36.5	50	2,478	
CMV-Tat	3-5	++	+	14.6	92.2	7.8	72	2,254	
Controllo	0	-	-	0	0	0	1	1,400	

^aCellule COS-1 (5×10^6) sono state transfettate mediante elettroporazione con 30 μ g di pCV-Tat, CMV-Tat o un DNA di controllo.

Quarantotto ore dopo la trasfezione, l'espressione di Tat è stata valutata mediante immunoistochimica con anticorpi monoclonali anti-Tat (i risultati

sono riportati come media dei valori della percentuale delle cellule positive) e determinando la localizzazione di Tat nucleare e citoplasmatica. La presenza di Tat intra- ed extra-cellulare è stata analizzata mediante radioimmunoprecipitazione sugli estratti cellulari (500 μ l) e nei terreni di cultura (4 ml) e successiva lettura densitometrica (Gelscan XL; Pharmacia) delle bande di Tat precipitate. L'attività del Tat intracellulare è stata misurata su estratti cellulari di cellule COS-1

4020333



cotrasfettate con i vettori esprimenti Tat, o il vettore di controllo, ed il plasmide HIV-1 LTR-CAT; l'attività del Tat extracellulare sull'induzione della proliferazione di cellule AIDS-KS (determinata mediante saggio di incorporazione della timidina triziata) è stata misurata nel terreno di cultura (diluito 1:2 e 1:4) delle cellule trasfettate con i plasmidi esprimenti Tat o il plasmide di controllo. I risultati corrispondono alla media di 5 esperimenti indipendenti.

^bAnalisi densitometrica della banda della proteina Tat immunoprecipitata. I valori sono espressi in una scala arbitraria, essendo 10 il valore minimo totale (Tat intra- ed extracellulare) evidenziato.

^c-, negativo; +, 50% di cellule Tat-positive; ++, 50-100% di cellule Tat-positive.

^dAttività CAT dopo 20 minuti di incubazione rispetto al vettore di controllo, il cui valore di attivazione è considerato uguale a 1

^eLa crescita delle cellule AIDS-KS è stata misurata mediante un saggio di incorporazione di timidina triziata (deviazione standard, DS: 12%). Il terreno delle cellule trasfettate con il DNA di controllo determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 1,400 cpm (DS: 11.5%). Il

terreno di cultura derivato da linfociti contenenti il virus HTLV-II (controllo positivo) determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 2,400 cpm (DS: 10%).

Dai risultati della Tabella 3 si osserva che nelle cellule trasfettate con pCV-Tat, rispetto alle cellule transfettate con CMV-Tat, a percentuale di cellule Tat-positive ed il contenuto totale di Tat è maggiore, la quantità

di Tat rilasciata è molto più elevata e correla con il contenuto totale e citoplasmatico di Tat, e l'attività biologica di Tat extracellulare sulla crescita delle cellule AIDS-KS è conseguentemente maggiore. Questi risultati indicano che il vettore pCV-Tat codifica per una proteina biologicamente attiva, induce alti livelli di espressione del cDNA del gene tat ed è in grado di rilasciare dalle cellule quantità di Tat molto maggiori rispetto al vettore CMV-Tat.

Il vettore pCV0 è utilizzato anche per l'espressione dei geni nef, rev e gag di HIV-1 e dei geni codificanti per le citochine IL-12 ed IL-15. I cDNA dei geni nef (618 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)] e rev (348 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], il gene gag (1500 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], o i cDNA dei geni IL-12 [Wolf et al., J. Immunol. 146:3074 (1991)] o IL-15 [Grabstein et al., Science 264:965 (1994)] sono amplificati mediante la

tecnica della "polimerase chain reaction" (PCR) utilizzando primers specifici complementari ai primi 15 nucleotidi della regione 5' (primer forward) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) o agli ultimi 15 nucleotidi della regione 3' del gene (primer reverse) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Inoltre, ciascun primer, sia forward che reverse, include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI in modo da consentire la clonazione dell'amplificato nel vettore pCV0. Dopo la clonazione si controlla la

sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA. Il vettore pCV0 è utilizzato anche per la co-espressione di Tat con altri geni virali di HIV-1 (rev, nef o gag) o con i geni delle citochine IL-12 o IL-15. A questo scopo il cDNA del gene tat di HIV-1 di 261 coppie di basi (Seq. 1, esempio 2) è amplificato mediante PCR con un primer forward che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P11) e un primer reverse complementare agli ultimi 15 nucleotidi del gene tat (Seq. P12). I geni virali (nef, rev o gag) e i geni delle citochine IL-12 o IL-15 sono amplificati con un primer forward che include inoltre una sequenza di 15 basi complementare alla regione 3' del gene tat, tale da permettere che il gene sia "in frame" con il gene tat (Seq. P13, P14, P15, P16, P17), ed un primer reverse che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Successivamente si esegue una terza reazione di PCR in cui il DNA template è rappresentato dagli amplificati del gene tat e del gene di interesse, il primer forward è rappresentato dal primer utilizzato per amplificare tat (Seq. P11) e il primer reverse da quello utilizzato per amplificare il gene di interesse (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). L'amplificato tat/gene di

interesse è purificato in gel di agarosio, digerito con PstI e clonato in pCV0. Dopo la clonazione si controlla la sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA, mentre l'espressione della proteina si determina mediante trasfezione come descritto in precedenza (Ensoli et al, J. Virol. 67: 2771993).

Sono riportate le sequenze dei primers sopra menzionati.

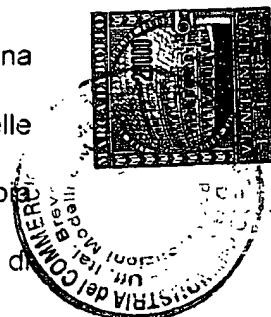
La tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare) della proteina Tat ricombinante prodotta con il metodo descritto e purificata tramite colonne di affinità di eparina è stata valutata nel modello sperimentale dei primati non umani delle scimmie cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Per attivare un'ampia risposta immune con un vaccino proteico abbiamo usato l'idrossido di alluminio (Alum) che è stato sperimentato in numerosi modelli ed è l'unico approvato per la sperimentazione nell'uomo. Tra gli adiuvanti particolati abbiamo usato il RIBI (appartenente al gruppo degli emulsionanti e composto da lipide A monofosforilico, dimicolato trealosio e scheletro della parete batterica del bacillo di Calmette-Guerin) [Audibert et al., Immunol. Today 14:281 (1993); Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. S10:S109 (1994)].

Nel primo esperimento pilota abbiamo inoculato 3 scimmie secondo il seguente schema:

Proteina Tat ricombinante (100 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 2)

Proteina Tat ricombinante (10 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 3) Scimmia

di controllo non inoculata. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue nei giorni -42 e -35 antecedenti la prima vaccinazione per la determinazione dei parametri di base. Campioni di sieri e di plasma sono stati congelati a -20°C o -80°C ed utilizzati successivamente per risospendere l'inoculo proteico. Le scimmie 1 e 2 erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Negli stessi giorni



1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

- Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'
- Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'
- Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'
- Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'
- Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'
- Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'
- Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'
- Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'
- Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3'
- Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'
- Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'
- Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'
- Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3'
- Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'
- Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3'
-
- Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3'
- Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'

Esempio 4. Inoculazione in *Macaca fascicularis* sani di un vaccino anti-Tat proteico: valutazione della sicurezza, tollerabilità, risposta immune specifica.

dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina), la valutazione di parametri immunologici, quali la presenza di immunoglobuline specifiche (IgM, IgG, IgA) i livelli di citochine del tipo Th1 (IL-2, IFN γ) e Th2 (IL-4, IL-10, IL-13), la produzione di chemochine (Rantes, MIP-1 e MIP-1), il fenotipo linfocitario (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56 e HLA-DR, CD45RA e CD45RO), la risposta proliferativa a Tat, la presenza di attività CTL e NK, e la presenza di attività antivirale mediata dalle cellule CD8⁺ (CAF). Inoltre, per valutare in vivo la presenza di una risposta cellulo-mediata tutte le scimmie vaccinate e quella di controllo erano sottoposte a "skin-test" per Tat. Questo esperimento pilota prevede un ulteriore richiamo di tutte le scimmie alla 32^a settimana ed infine un richiamo con la proteina Tat risospesa in Iscom (immune stimulating complex). L'iscom è un adiuvante composto dalla saponina Quil A, colesterolo e fosfolipidi in grado di incrementare la risposta umorale e cellulare [Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994); Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)]. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il "challenge" delle scimmie vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 41^a settimana dell'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID50 (50% monkey infectious doses) di "simian-human immunodeficiency virus" (SHIV) cresciuto e titolato in *Macaca fascicularis* e contenente il gene tat e/o il gene nef e

rev di HIV [Shibata et al., J. Virol. 65:314 (1991); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994); Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995); Reinmann et al., J. Virol. 31: 98 (1996)]. Il monitoraggio post-challenge (ogni 2 settimane a partire dal giorno del challenge per il primo mese, ogni 4 settimane per i successivi 3 mesi, ed ogni 8 settimane fino a 6 mesi dal challenge) includerà anche l'analisi di parametri virologici quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. I risultati di questo esperimento relativi alle prime 27 settimane dall'inizio del protocollo sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che la proteina Tat era ben tollerata dagli animali e non era tossica nelle dosi somministrate, utilizzando le vie di inoculazioni scelte. Nelle scimmie 1 e 2 erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 5^a settimana dopo la prima inoculazione. Alla 27^a settimana IgG anti-Tat erano evidenziabili alla diluizione di 1:3200 e 1:6400 nel plasma della scimmia 1 e 2 rispettivamente. I risultati sono riportati nelle figure 2 e 3. I risultati attualmente disponibili dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana (Tabella 4) nelle scimmie inoculate con il Tat, essendo maggiore nella scimmia 2 che riceveva ad ogni inoculazione 10 µg di proteina Tat ricombinante.

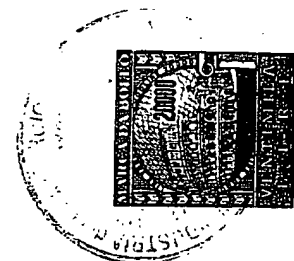
1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

TABELLA 4

Risposta proliferativa al Tat alla 22a settimana post-immunizzazione^a

N _i scimmia	Stimolo	Indice di stimolazione
1	PHA	13,95
	TT	4,68
	Tat	2,45
2	PHA	11,57
	TT	3,77
	Tat	3,04
3	PHA	19,9
	TT	6,23
	Tat	1,38



^aLinfociti di sangue periferico isolati mediante gradiente di Ficoll e seminati a 2×10^5 cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96

pozzetti, erano cresciute in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e stimulate con Tat ($5 \mu\text{g/ml}$), PHA ($4 \mu\text{g/ml}$), o tossoide del tetano (TT) ($10 \mu\text{g/ml}$), contro cui tutti le scimmie erano vaccinate. Campioni di controllo erano incubati solo con il terreno di crescita. L'incremento della proliferazione cellulare era determinata al 5^o giorno con saggio di incorporazione di timidina triziata come descritto [Ensoli et

al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241 (1988);
Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)]. I risultati sono
riportati come indice di stimolazione (che era calcolato secondo la
seguente formula: Media dei cpm del campione/media dei cpm dei
controlli. Sono considerati positivi i valori superiori a 2). Le scimmie 1 e 2
erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 µg e 10 µg,
rispettivamente) risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed
inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia 3 è una scimmia di
controllo non inoculata.

I risultati di questo esperimento pilota indicano che la proteina Tat
ricombinante, prodotta e purificata con il protocollo da noi descritto, non
era tossica alle dosi di 100 e 10 µg inoculate per via sottocutanea ed
era in grado di indurre una risposta immune specifica sia umorale che
cellulo-mediata. La risposta immune specifica anti-Tat era maggiore
nella scimmia 2, immunizzata con 10 µg di proteina ricombinante.
Inoltre, anche l'adiuvante RIBI non era apparentemente tossico negli
animali.

In un esperimento iniziato successivamente abbiamo valutato l'effetto
dell'immunizzazione indotta da Tat in combinazione con il RIBI o con
l'Alum. Le scimmie sono state inoculate per via sottocutanea in un unico
sito secondo il seguente schema. Scimmie 1-3 : 10 µg di proteina Tat
ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI.
Scimmie 4-6: 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di
siero autologo e 250 µl di Alum. Scimmia 7: RIBI 250 µl e 250 µl di siero

autologo. Scimmia 8: Alum 250 µl e 250 µl di siero autologo. Da tutte le scimmie sono stati prelevati 10 ml di sangue al giorno -9, antecedente la prima vaccinazione, per potere eseguire le analisi descritte nel primo esperimento pilota e disporre dei parametri di base di ciascun animale. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. Negli stessi giorni dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami descritti nel primo esperimento pilota. Inoltre, sono prelevati campioni di urine ed eseguiti tamponi vaginali sui quali sarà determinata la presenza di IgA secretorie specifiche. Questo esperimento pilota prevede due richiami alla 21^a e 26^a settimana delle scimmie 1-6 con l'immunogeno proteico ed adiuvanti e delle scimmie 7 e 8 con solo gli adiuvanti. Infine, verrà eseguito un ultimo richiamo alla 31^a settimana con la proteina Tat risospesa in Iscom. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il challenge delle scimmie, vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 40^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ di SHIV. Il monitoraggio post-challenge verrà eseguito come descritto per il primo esperimento pilota.

I risultati del secondo esperimento pilota, attualmente disponibili e relativi alla 15^a settimana dall'inizio della vaccinazione, sono i seguenti. Negli animali non si osservavano alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Le scimmie non presentavano infiammazione o segni di neovascolarizzazione nei siti di inoculazione. E' stata dimostrata la presenza di una risposta anticorpale

(IgM, IgG) specifica. Alla 15^a settimana i titoli anticorpali (IgG) anti-Tat raggiungevano valori elevati e variabili da 1:12.800 a titoli maggiori di 1:50.000 (figure 4-6). Inoltre l'attività neutralizzante il Tat del siero delle scimmie vaccinate veniva saggiata mediante saggi di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come precedentemente descritto [Ensoli et al., J. Virol. (1993)]. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1-6 diluiti 1:2 ottenuto alla 15^a settimana dal primo inoculo erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel sopranatante delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) o i controlli negativi non avevano attività bloccante verso il Tat (Tabelia 5).

TABELLA 5

Attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare.

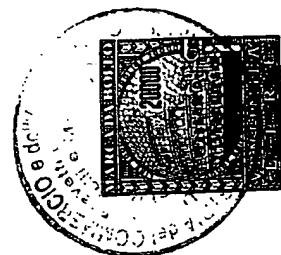
Campioni	HIV-1 p24 (pg/ml)
Tat	61.88
Tat + Siero preimmune M1	46.80
Tat + Siero preimmune M2	22.96
Tat + Siero preimmune M3	96.98
Tat + Siero preimmune M4	126.68
Tat + Siero preimmune M5	27.03
Tat + Siero preimmune M6	78.61
Tat + Siero immune M1	4.77

H 00.00.00

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

Tat + Siero immune M2	4.86
Tat + Siero immune M3	Neg.
Tat + Siero immune M4	Neg.
Tat + Siero immune M5	7.88
Tat + Siero immune M6	4.55
Pool M1-6 (controllo preimmune)	Neg.
Pool M1-6 (controllo immune)	Neg.
PBS + 0.1% BSA	Neg.



L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1 (cellule HeLa contenenti integrata una copia del provirus HIV-1 difettivo del gene tat). Cellule HLM-1 sono state piastrate alla concentrazione di 6×10^5 /pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37°C per 16 ore. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0.1%, ed incubate per 48 ore con terreno di crescita (0.3 ml) a cui veniva aggiunta la proteina Tat ricombinante (30 ng/ml) da sola o in presenza di un ugual volume di siero (diluito 1:2) delle scimmie prelevati al tempo 0 (sieri preimmuni) o alla 15^a settimana (sieri immuni). I controlli erano rappresentati dalle

cellule trattate solo con un pool dei sieri preimmuni, immuni, o con PBS contenente BSA allo 0.1% (PBS + 0.1% BSA) ma in assenza di Tat. Ogni campione è stato saggiato in doppio. Sui supernatanti cellulari era quindi determinata la presenza di virus rilasciato dalle cellule mediante determinazione dei valori di antigene p24, utilizzando un kit commerciale p24 antigene capture - Elisa (Nen Dupont). I risultati sono espressi come

H 02.03.99

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

valori di p24 (pg/ml) presenti nei terreni e corrispondono alla media dei valori ottenuti dai due pozzetti per ciascun campione.

Alla 11^a settimana era inoltre evidente una risposta proliferativa specifica al Tat nelle scimmie 2 e 3 inoculate con la proteina Tat ed il RIBI e nella scimmia 4 inoculata con la proteina Tat e l'Aium che aumentava alla 15^a settimana (Tabella 5).

H 02.03.99

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

1354PTIT

TABELLA 6.

Risposta proliferativa al Tat^a

Settimane dell'inizio della immunizzazione

N° scimmia	Stimolo	0	6	11	15
1	PHA	16,96	22,83	10,50	15,27
	TT	11,69	2,16	1,96	3,01
	Tat	1,12	1,94	1,55	0,52
2	PHA	31,27	29,37	25,75	21,28
	TT	1,12	2,16	1,8	0,57
	Tat	1,08	2,05	3,65	6,22
3	PHA	22,42	39,15	7,89	16,88
	TT	11,43	1,72	0,95	1,71
	Tat	1,65	1,44	2,69	18,82
4	PHA	3,88	13,85	20,77	15,22
	TT	2,85	3,90	4,49	9,07
	Tat	1,29	1,88	3,01	3,24
5	PHA	6,50	11,39	5,74	16,74
	TT	2,31	3,22	1,07	4,84
	Tat	1,80	1,02	0,66	1,76
6	PHA	11,96	7,01	17,94	2,77
	TT	4,14	5,01	1,71	0,13
	Tat	1,37	2,47	1,06	0,11
7	PHA	21,65	25,20	20,30	37,93
	TT	0,97	1,30	0,80	0,88

	Tat	1,78	1,12	0,68	0,73
8	PHA	26,51	21,44	67,09	16,38
	TT	1,20	2,03	10,78	0,20
	Tat	1,12	0,97	0,00	0,21

^aLinfociti di sangue periferico isolati, piastrati e cresciuti come descritto, venivano stimolati con PHA (4 μ g/ml), il tossoide tetanico (TT) e Tat (5 o 1 μ g/ml) e saggiati, come descritto in Tabella 4. Le scimmie 1-3 erano inoculate con 10 μ g di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI; 3 scimmie 4-6 erano inoculate oppure con 10 μ g di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo)(scimmia 7) e con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo)(scimmia 8).

Inoltre, alla 15^a settimana 5 scimmie inoculate con la proteina ricombinante (scimmie 2-6) reagivano allo skin test, ulteriormente indicando la presenza di una risposta cellulo-mediata evidenziata da una forte reazione di ipersensibilità ritardata (Tabella 7 e figura 7).

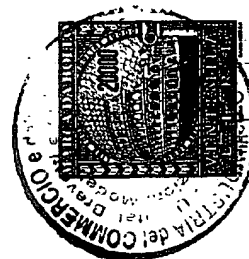
1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

TABELLA 7.

Skin-test al Tat^a

	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione	
N° scimmie	11	15
1	-	-
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	+	+
6	-	+
7	ND	ND
8	ND	ND



^aTat (5, 1 e 0.2 μ g) in 150 μ l di PBS-0.1% BSA ed il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a ed alla 15^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. La comparsa di eritema dopo 24, 48 o 72 ore veniva considerata come risposta positiva.

Questi risultati indicano che l'immunogeno, nonché entrambi gli adiuvanti RIBI e alum, erano ben tollerati dagli animali e non erano tossici, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione con Tat ottenuti nel primo esperimento pilota. Inoltre, questi dati confermano l'osservazione riportata nel primo esperimento

ovvero che la proteina ricombinante Tat induce una forte risposta umorale e cellulare specifica anti-Tat in vitro e in vivo.

Esempio 5. La costimolazione con biglie anti-CD3/28 di linfociti CD4+ purificati da scimmie infette con SIV+ induce l'espansione logaritmica del numero delle cellule in assenza di significativa replicazione e propagazione del virus.

Le cellule del sangue periferico sono state deplete della sottopopolazione CD8 mediante l'impiego di biglie paramagnetiche anti-CD8 (Dynal, Oslo; Dynabeads M-450 CD8) e la purezza delle popolazioni ottenute è stata valutata tramite l'analisi citofluorimetrica e considerata accettabile se maggiore del 95%. Le cellule CD8 deplete (denominate CD8-PBMC) sono state messe in coltura e stimolate con PHA (2µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o con biglie paramagnetiche previamente coniugate con due anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD3 (Clone FN18, Biosource) e CD28 (Clone 9.3, omaggio del Dr. Carl June) (biglie anti-CD3/28). Allo scopo di facilitare il legame con le biglie anti-CD3/28 l'incubazione è avvenuta su un dispositivo rotante e le cellule coniugate, selezionate con l'ausilio di un magnete, sono state

denominate CD8-CD3+CD28+ e poste in coltura. La concentrazione delle cellule è stata riportata a quella di partenza 3 volte a settimana ed è stata aggiunta IL-2 ove indicato; inoltre per quanto riguarda le cellule stimolate con biglie anti-CD3/28, esperimenti preliminari hanno dimostrato la convenienza dell'utilizzo di un regime di stimolazione continua ripristinando il rapporto ottimale biglie/cellule ad ogni conta

eseguita. Nostri studi hanno infatti dimostrato che in assenza di IL-2 esogena la sottopopolazione CD8-CD3+CD28+ prolifera significativamente meglio delle cellule CD8⁺PBMC in risposta alla costimolazione con biglie anti-CD3/28 e che l'aggiunta di IL-2 (40 U/mL, 3 volte alla settimana) migliora significativamente la cinetica di proliferazione sia per durata che per numero di cellule ottenute (figura 8).

Allo scopo di valutare l'attività antivirale, cellule CD8-CD3+CD28+ purificate da 4 animali SIV⁺ sono stati infettate al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIV e mantenute in condizioni di stimolazione continua; come controllo sono stati impiegati CD8⁺PBMC stimolati con PHA e IL-2. L'andamento dell'infezione è stato monitorato mediante determinazione dell'antigene virale p27gag nei sovrinatanti delle colture utilizzando un kit ELISA commerciale (Coulter, Hialeah, FL). I livelli di p27 (ng/ml) misurati al giorno 6 e 12 post infezione e riportati in Figura 9 hanno indicato una netta differenza fra le due condizioni di stimolazione in termini di produttività dell'infezione. Infatti al giorno 6 la riduzione percentuale della p27 rispetto ai campioni stimolati con PHA e IL-2 era

compresa fra il 40% e l'87% e al giorno 12 tale riduzione era incrementata in 2 soggetti su 4 suggerendo una minore permissività delle cellule all'infezione virale. In un solo caso (mk 9401) abbiamo registrato la propagazione dell'infezione anche nella condizione di stimolazione con biglie anti-CD3/28. I risultati descritti dimostrano che il *Macacus fascicularis* rappresenta un buon modello per la espansione ex

vivo di sottopopolazioni linfocitarie in assenza di significativa replicazione virale mediante costimolazione con biglie anti-CD3/28 e costituisce il razionale per un vaccino terapeutico basato sulla espansione e reinfusione, in soggetti infetti con HIV, di linfociti autologhi specifici per gli antigeni virali proposti.

Esempio profetico 6. Inculazione in *Macaca fascicularis* di un vaccino anti-Tat a DNA.

E' proposta l'inoculazione diretta del DNA del plasmide pCV-Tat, contenente il cDNA del gene tat wild-type, e pCV0 come DNA di controllo. I DNA plasmidici da somministrare agli animali, sono amplificati in batteri E.Coli (ceppo DH5) secondo procedure standard [Molecular cloning - A Laboratory manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] e secondo protocolli stabiliti dalla "European Agency for the evaluation of medicinal products: Human Medicine Evaluation Unit" (Technical Report Series No. 17 January 1997), purificati mediante due gradienti di CsCl e dializzati per 48-72 ore contro 100 volumi di PBS (senza Ca++ e Mg++) sterile. I DNA sono controllati mediante

digestione con enzimi di restrizione, i cui siti di taglio sul DNA plasmidico sono noti, e la loro funzionalità controllata mediante transfezione di 5-10 µg di DNA con la tecnica del fosfato di calcio [Molecular cloning - A Laboratory Manual; Eds. Maniatis t., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] in cellule H3T1 (1×10^6), che derivano da cellule HeLa contenenti integrato una copia del plasmide reporter HIV-1 LTR-CAT, e

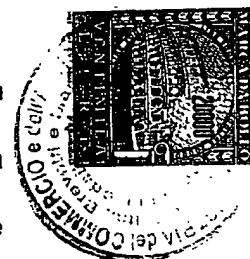
1354PTIT

H 02.03.99
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A. *[signature]*

48 ore dopo determinazione dell'attività dell'enzima CAT [Gorman et al. Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982)].

I DNA di pCV-Tat o di pCV0 (0.5-2 mg) risospesi in soluzione fisiologica saranno inoculati per via intramuscolare in due siti. 2-5 giorni prima della vaccinazione, gli animali verranno inoculati con 1 ml di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente verrà eseguita la vaccinazione, per aumentare l'uptake e l'espressione del DNA nel muscolo [Danko et al., Vaccine 12:1499 (1994); Fine et al., Ann. Plast. Surg. 20:6 (1938)]. Le scimmie saranno inoculate al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Infine alla 32^a settimana sarà eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza di Iscom. Gli animali saranno osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'esempio 4. Inoltre si preleveranno campioni di 10 ml di sangue prima dell'inizio della immunizzazione e negli stessi giorni della inoculazione come descritto nell'esempio 4. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà determinato dopo il "challenge" delle scimmie, che

sarà attenuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID50 di SHIV. Il monitoraggio post-challenge sarà effettuato come descritto nell'esempio 4. Saranno valutati anche protocolli di immunizzazione in cui saranno inclusi combinazioni dei DNA esprimenti gli altri geni di HIV-1 e/o citochine, descritti nell'esempio 3.



I DNA di plasmidi pCV0 e pCVTat possono essere inoculati negli animali utilizzando altri sistemi di "delivery" che potrebbero rendere più efficace l'immunizzazione, quali l'uso di liposomi, nanoparticelle o "gene gun".

Esempio profetico 7. Uso delle cellule dendritiche

I precursori di cellule dendritiche saranno isolati dal sangue periferico di primati non umani appartenenti alla specie *Macaca fascicularis* mediante coltura in vitro di cellule aderenti con GM-CSF e IL-4 per 7-14 giorni. L'analisi morfologica e la caratterizzazione fenotipica (FACS analisi e immunoistochimica dopo cytopspin) verranno condotte per confermare la identità delle cellule ottenute in coltura. L'analisi funzionale si baserà sulla capacità delle cellule isolate di indurre la proliferazione di linfociti allogenici, caratteristica distintiva delle cellule dendritiche.

Le cellule dendritiche risospese alla concentrazione di $1 \times 10^5 / 100 \mu l$ in RPMI 1640 contenente il 5% di siero autologo, 10 mM di HEPES buffer, 100 U/ml. di penicillina-streptomicina, 0.5 mg/ml di amfotericina B, e glutammina allo 0.03% saranno incubate per 2 ore a 37°C in presenza di Tat o di suoi peptidi o delle combinazioni Tat, Rev, Nef, Gag e/o citochine e successivamente inoculate 2 o più volte a distanza di 2-4

settimane per via endovenosa. Alternativamente, le cellule dendritiche verranno trasdotte con vettori contenenti il gene tat da solo o associato con gli altri vettori summenzionati e successivamente inoculate endovena.

Esempio Profetico 8. Vaccinazione terapeutica

Per stabilire l'efficacia di una vaccinazione terapeutica anti-Tat, sia

proteica che a DNA, verranno allestiti esperimenti in scimmie già infettate con SHIV in fase asintomatica e sintomatica. In particolare si valuterà la comparsa di alterazioni nel sito di inoculo e di sintomi generali nelle scimmie asintomatiche e di modificazioni della sintomatologia in animali già sintomatici. Benché remota, esiste infatti la possibilità che in scimmie infette l'inoculazione del Tat aumenti la replicazione virale. Tuttavia, questo effetto dovrebbe essere transitorio in considerazione sia della dose modesta di Tat inoculata, che della breve emivita della proteina transattivatrice ($T_{1/2}$: 12 h). Nel caso ciò si dovesse verificare impiegheremo i mutanti del Tat (sotto forma di proteine, peptidi o di DNA), descritti nell'esempio 2. Alternativamente utilizzeremo in congiunzione con il vaccino, inibitori della replicazione virale. Per valutare gli effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia, il monitoraggio dei parametri clinici, di laboratorio e viro-immunologici (descritti sopra) verrà effettuato al tempo zero, al momento della successiva somministrazione dell'immunogeno e 30 giorni dopo la stessa. Dopo l'ultima inoculazione il monitoraggio avverrà con frequenza mensile ed ogni qualvolta siano apparsi segni indicanti

un repentino cambiamento del quadro clinico. Campioni di PBMC, siero, plasma ed urine verranno congelati ad ogni controllo per successive valutazioni come descritto in precedenza.

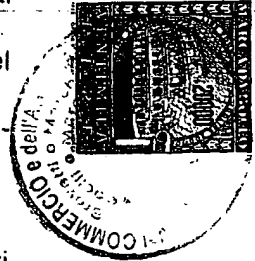
Esempio profetico 9. Stimolazione dell'immunità mucosale

Gli immunogeni descritti saranno utilizzati per indurre e/o potenziare una risposta immune specifica a livello delle mucose. Uno degli approcci che verrà utilizzato si basa sull'uso di batteri (*Streptococco*

gordonii, commensale della cavità orale dell'uomo) "ingegnerizzati" ad esprimere gli antigeni virali sopra menzionati. Questi batteri sono in grado di colonizzare la mucosa orale e vaginale nei topi, e di indurre una risposta anticorpale specifica locale e sistemica nei confronti degli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti [Oggioni et al., Vaccine 13: 775 (1995); Medaglini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6868 (1995); Medaglini et al., Vaccine 1997, in press]. L'inventore ritiene che questo metodo possa essere utilizzato con successo per indurre nelle scimmie cynomolgus l'immunizzazione specifica anche per via vaginale. Alternativamente l'immunità mucosale può essere indotta con gli immunogeni proteici descritti sopra, utilizzando altri sistemi di "delivery" batterici e non quali le citofectine ed i liposomi, e le vie di inoculazione che sono in grado da indurre la più efficace risposta immune e protettiva [Lewis et al., Vaccine Press, Ed. Robinson, Farrar, Wible: Human Press, Totowa, New Jersey (1996); Lehnen et al., Vaccine Research 1:319 (1992); Honerbang et al., Infect. Immun. 62:15 (1994)].

RIVENDICAZIONI

1. Vaccino contro l'AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta).
2. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag.
3. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.
4. Vaccino a DNA contro l' AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente molecole o frammenti di DNA codificanti per Tat wild-type o per i mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), dette molecole o frammenti di DNA essendo inseriti nel vettore plasmidico pCVC.0
5. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA dei geni nef, rev e gag.
6. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA delle citochine immunomodulatrici di IL -12 e IL -15.
7. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta) o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per



1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

immunizzare cellule dendritiche autologhe indotte ad esprimere gli antigeni corrispondenti.

8. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule dendritiche autologhe trasdotte con vettori eucariotici contenenti dette proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e i suoi mutanti e relative combinazioni.
9. Impiego secondo le riv. 7 e 8 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzazione a livello mucosale.
10. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule del sangue periferico tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3

e anti-CD28.

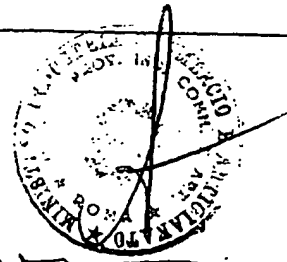
/PV-Roma,

per Ensoli Barbara

il Mandatario

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.



H 02.00.00

NOTARE BARTOLO & GERVASI S.p.A.

76

0.3

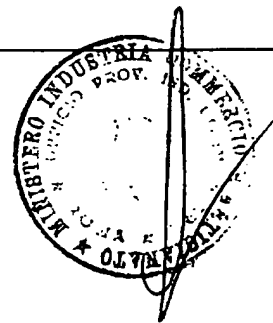
% Acetylation

+

++

TAT
TAT22

Fig.1



NOTA BARTOLO & GERVA S.D.A.

Man Vito

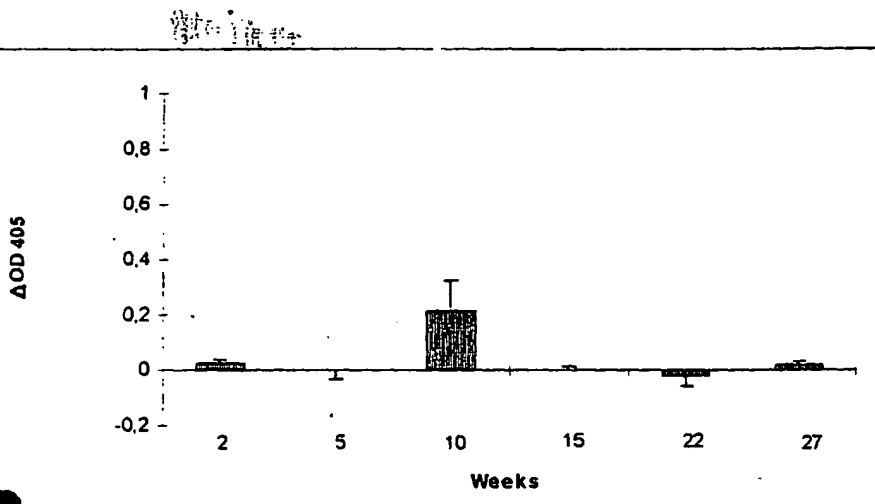
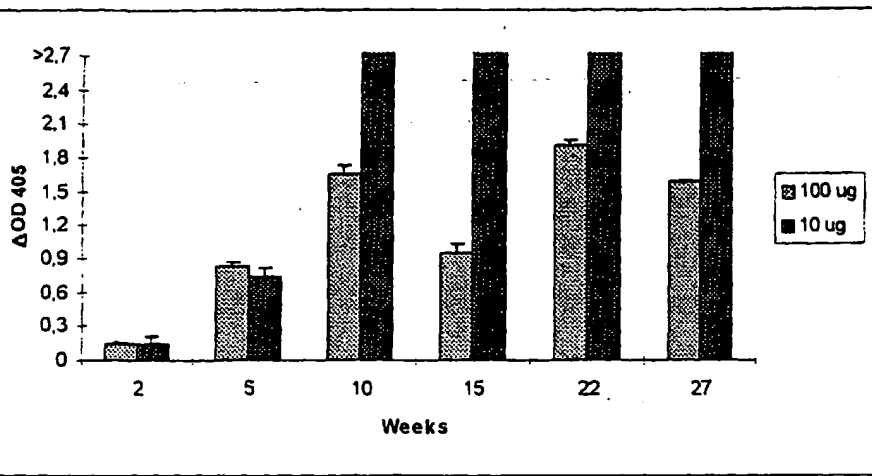
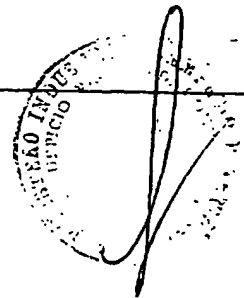


Fig.2



H 000000

NOTARBAATOLO & GERVASI S.p.A.

Maria Vittoria

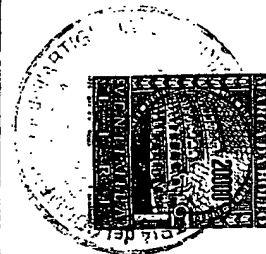
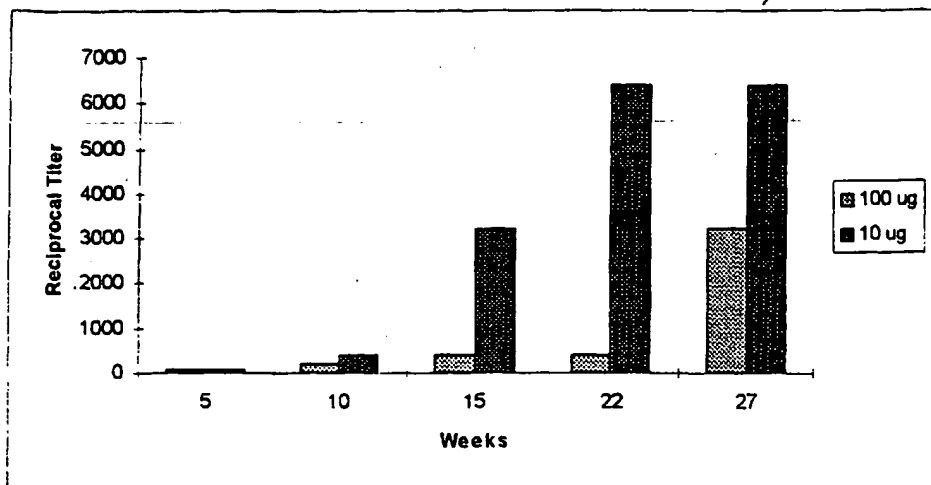


Fig.3

[Signature]

H 02.03.99

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

More Vittorio

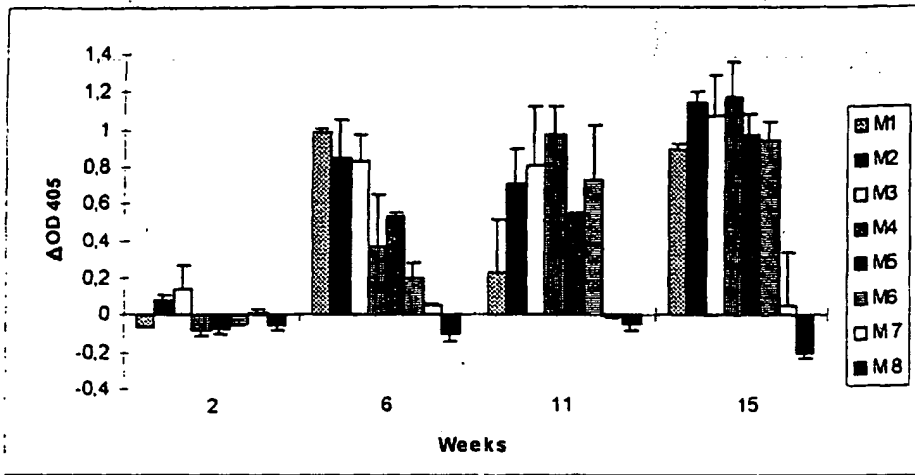


Fig.4

[Signature]

More Vittorio

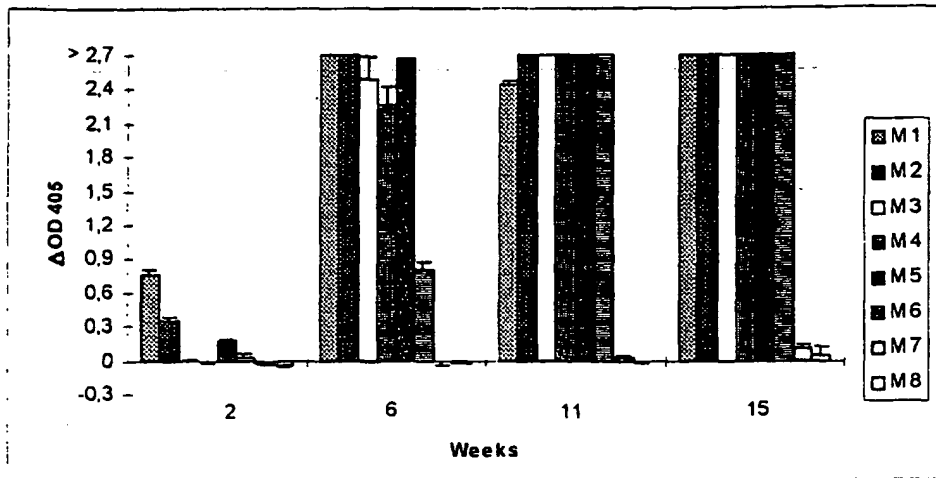
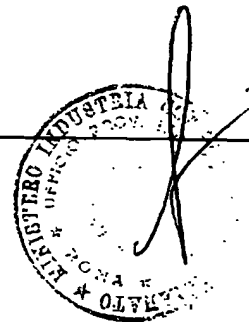


Fig.5



More More June

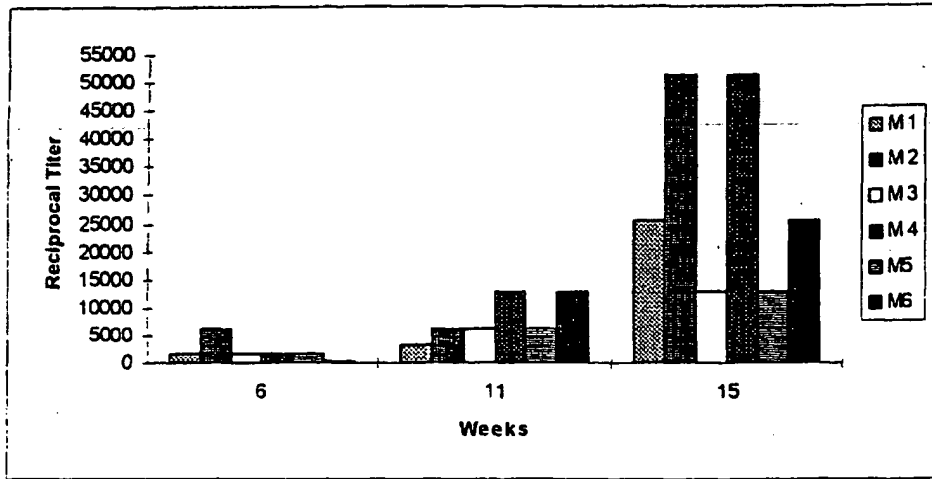
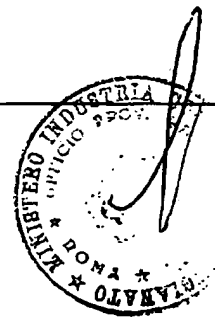


Fig.6



NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

M. Vittorini

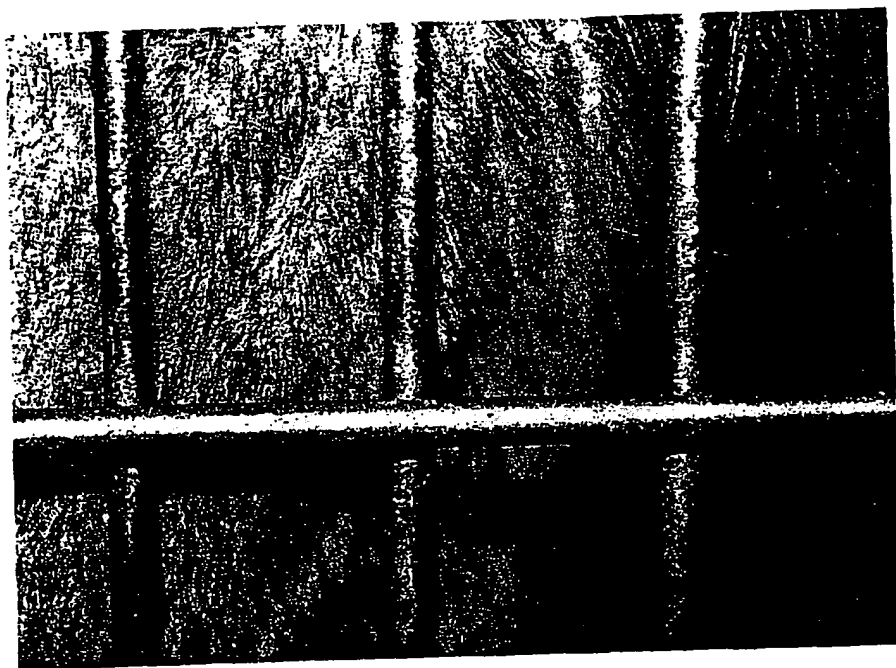


Fig.7



NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

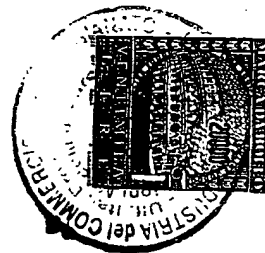
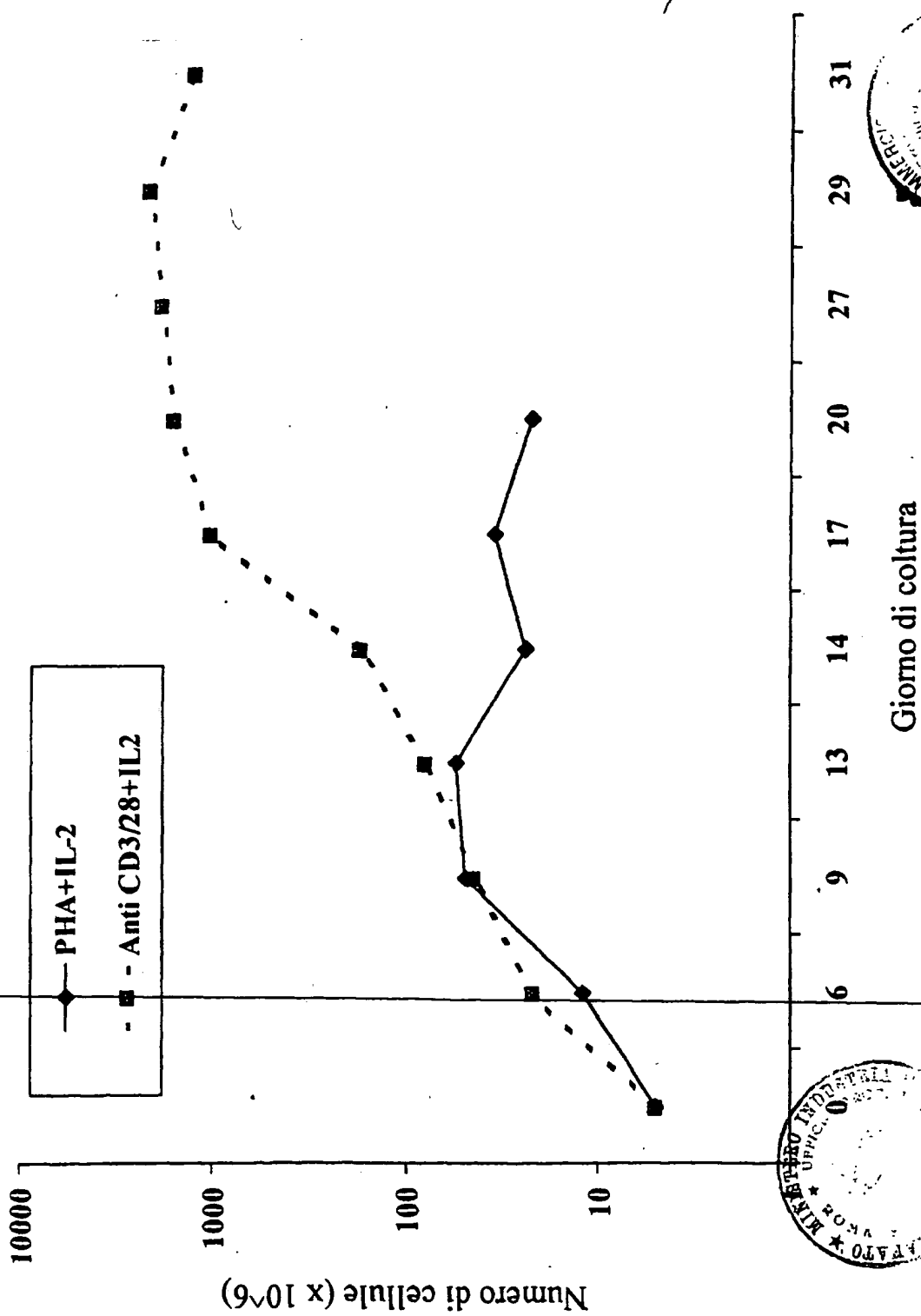
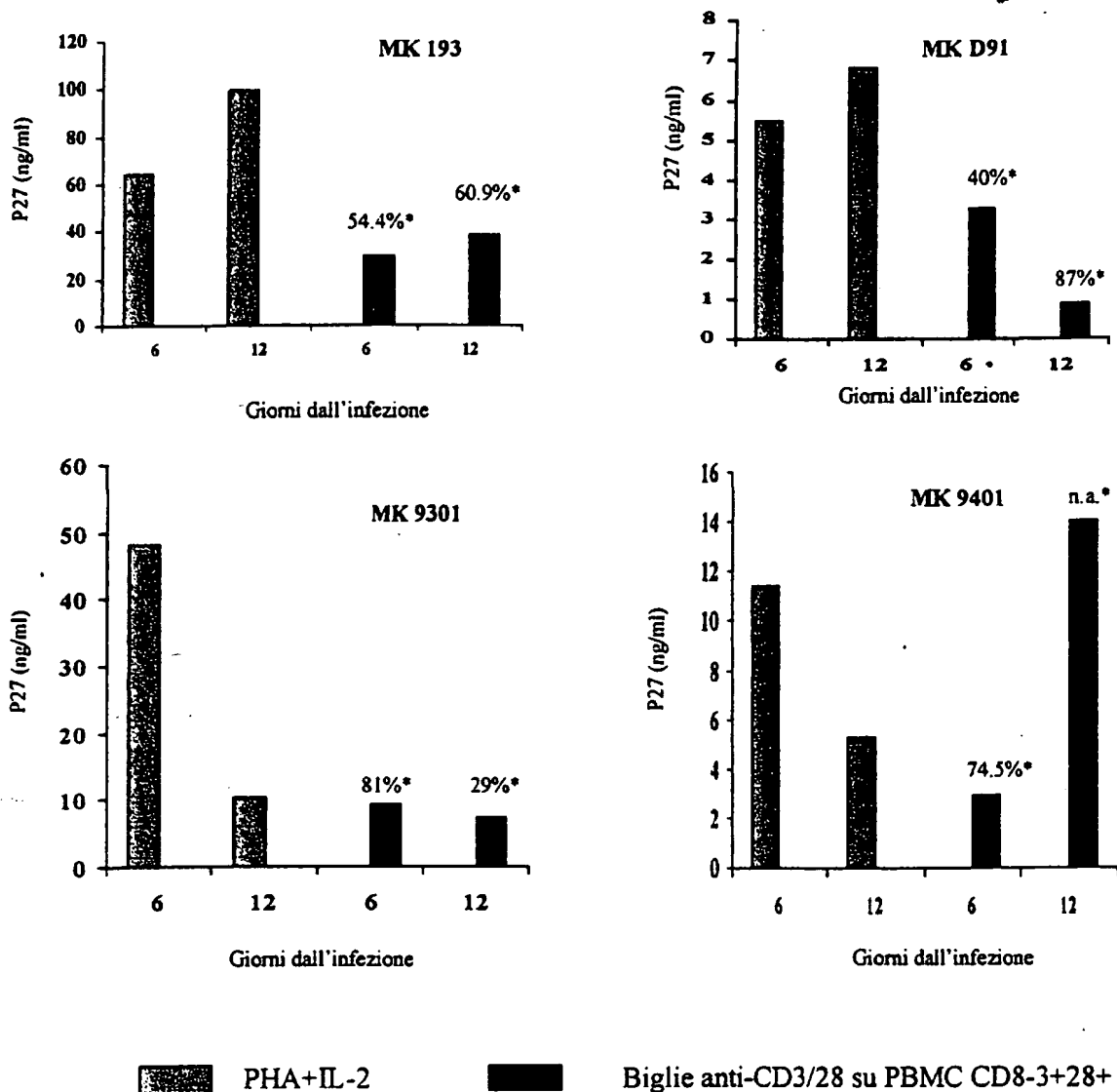
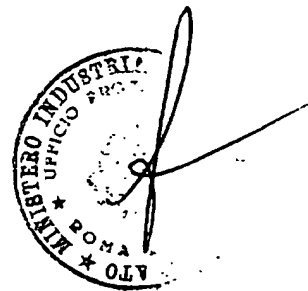


Figura 8



*) : Percentuale di inibizione.

Figura 9



ISTANZA PER LA PRESA IN CARICO DI UNA INVENZIONE

Il sottoscritto ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' di nazionalità italiana, con sede in ROMA, a mezzo Mandatario Dr.a MARIA VITTORIA PRIMICERI (albo n. 465) della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA, Via Savoia, 82, Roma, presso cui elegge domicilio a tutti gli effetti di legge, attuale titolare della domanda di brevetto per invenzione industriale n. RM 97 A 000743 del 01.12.1997 a nome di Ensoli Barbara, ma ceduto a Istituto Superiore di Sanità con verbale di deposito di nota di trascrizione (protocollo n. MIE000907 del 05.08.1998), fa domanda a codesto Ministero affinché venga registrata la presa in carico della domanda di brevetto per invenzione industriale per l'espletamento di qualsiasi ulteriore pratica relativa alla domanda sopra identificata da parte della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA, Via Savoia, 82 Roma, in base agli articoli 93 e 94 R.D. 29.06.1939 come modificati dal D.P.R. 22.6.79 n.

Si allega:



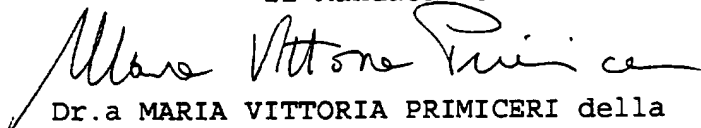
H 02.03.99

- lettera d'incarico
- fotocopia del verbale di deposito di nota di trascrizione
- fotocopia dell'atto di cessione del 03.06.1998

Roma, 15 Ottobre 1998

p. ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

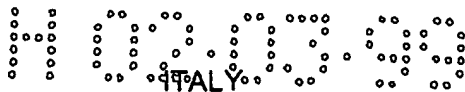
Il Mandatario


Dr.a MARIA VITTORIA PRIMICERI della

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A

1354PTIT

ITALIA



LETTERA D'INCARICO

POWER OF ATTORNEY

Numero della domanda

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

/ la sottoscritt / The undersigned

Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

con sede/residing at

Incarica

Authorizes

Gemma Gervasi (n. 238 BM), Diego Pallini (n. 484 BM), Angelo Passini (n. 73 BM),
Giorgio Coggi (n. 148 BM), Giorgio Moretti (n. 206 BM), Giulio Mariani (n. 329 BM),
Maria Vittoria Primiceri (n. 465 BM), Livio Brighenti (n. 475 BM), Raffaella Asensio (n. 504 BM),
Cristina Cazzetta (n. 575 M), Roberto Ramponi (n. 715 M), Antonio Nesti (n. 792 BM),
Franco Oriti (n. 793 M), Paolo Gerli (n. 814 B)

della società **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**, di
agire come propri mandatari, con firma libera e
disgiunta, per il deposito in Italia presso il Ministero
dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato
(Ufficio Italiano Brevetti e Marchi) o presso uno
degli Uffici Provinciali dell'Industria Commercio e
dell'Artigianato, di una domanda di

of **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**, to act as
representatives (individually and collectively) to file
in Italy, by the Ministry of Industry, Trade and
Craftmanship (Italian Patent and Trademark Office)
or by the competent receiving Section of the Italian
Chamber of Commerce, an application for

per la presa in carico della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale
n. RM97A000743 del 01.12.1997

e di fare quant'altro occorra per l'accoglimento
della domanda stessa e per il riconoscimento dei
diritti e delle facoltà che da essa derivano nei
rapporti col Ministero dell'Industria, del Commercio
e dell'Artigianato (presentazione di documenti,
pagamento di tasse, richieste di certificati e di
copie autentiche, richieste di rimborsi e riscossioni
delle somme ammesse a rimborso, modificazioni o
ritiro della domanda, ritiro degli attestati rilasciati e
dei documenti relativi, presentazione e
documentazione del ricorso alla Commissione di
cui all'art. 71 del R.D. 29 giugno 1939, n. 1127). A
tale scopo sottoscritt elegg domicilio presso
la società **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.** - Corso
di Porta Vittoria, 9 - 20122 Milano, Italia, alla quale
pertanto verranno fatte direttamente dal Ministero
dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato
tutte le comunicazioni, nonché le richieste e tutte le
consegne di documenti che si rendessero
necessarie.

and to do whatever else may be necessary to have
the application accepted and to obtain
acknowledgement of the rights and powers
deriving therefrom in connection with the Ministry
of Industry, Trade and Craftmanship (filing of
documents, payment of taxes, requests of
documents and certified copies, applications for
refund and collection of moneys admitted to be
refunded, amending or withdrawing of the
application, receiving the letters patents when
granted and documents relating to same, filing and
arguing appeals to the Commission provided for by
Art. 71 of Royal Decree 29th June 1939, n. 1127).
For this purpose the undersigned elect domicile at
Notarbartolo & Gervasi S.p.A. - Corso di Porta
Vittoria, 9 - 20122 Milano, Italy, where the Ministry
of Industry, Trade and Craftmanship will address
directly all communications as well as all requests
and deliver all documents that may become
necessary.

15 OTT. 1998

Il Direttore dell'Istituto
Superiore di Sanità
(Prof. Giuseppe Benagiano)

Data/Date

Firma/Signature

[Handwritten signature]

Il Mandatario/ Patent Attorney

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano

SERVIZIO DEI BREVETTI PER INVENZIONI MODELLI E MARCHE
VERBALE DI DEPOSITO DI NOTA DI TRASCRIZIONE

L'anno 1998 il giorno CINQUE del mese di AGOSTO

la Ditta ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

con sede in ROMA, VIALE REGINA ELENA N.299 - ITALIA

a mezzo mandatarî : DR. DIEGO PALLINI (ALBO N.484) ED ALTRI

ed elettivamente comitanti agli effetti di legge a Milano presso CORSO DI PORTA VITTORIA N.9

presso NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.

ha presentato a me sottoscritto:

- 1) Nota di trascrizione, sotto forma di domanda, in duplo, riferentesi
al brevetto per INVENZIONE NO.RM97A000743 DEL 01.12.1997.

domanda di brevetto n.

BREV.MI-E

000907

- 2) Lettera d'incarico - ~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~

- 3) Versamento c/ c postale n. 00668004 intestato all'Ufficio registro tasse e concessioni di Roma di L. 120.000. =
emesso dall'Ufficio di _____ in data _____

- 4) Atto da trascrivere COPIA AUTENTICA ATTO DI CESSIONE, SOTTOSCRITTO PER LA CEDENTE PERSONALMENTE DALLA SIG.RA BARBARA ENSOLI E SOTTOSCRITTO PER LA CESSIONARIA DAL SIG.R.R. DI GIACOMO, LE CUI FIRME SONO STATE AUTENTICATE DAL DR.G.FIORIDI, NOTAIO IN ROMA IL 24.04.98. DETTO ATTO È STATO REGISTRATO IN DATA 12.05.1998, ALL'UFFICIO DEL REGISTRO DI ROMA.

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI

Atto di CESSIONE trascrizione n. _____
a carico di BARBARA ENSOLI RESIDENTE IN ROMA, VIA FOSTO AVIENO 176 - ITALIA.

a favore di ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' CON SEDE IN ROMA, VIALE REGINA ELENA N.299 -
ITALIA.

Brevetto per INVENZIONI ~~XXXXXXXX~~ ~~XXXXXXXX~~

BREVETTO NO.RM97A000743 DEL 01.12.1997.

La nota di cui sopra è stata da me controfirmata e bollata col timbro d'ufficio

IL DEPOSITANTE

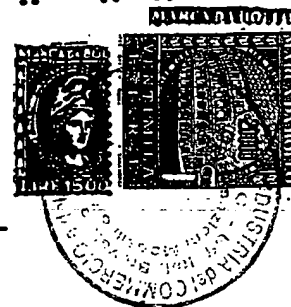


L'UFFICIALE ROGANTE

Per copia conforme all'originale

«Si precisa che per tale domanda è allegato l'imposta di bollo e stata assolta conformemente alla circolare n° 163/83 dell'U.C.B. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno dallo stesso richieste in sede di concessione»

Il Direttore
Dott. M. Colosimo



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTI-
GIANATO - Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

NOTA DI TRASCRIZIONE

La richiedente ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA', di na-
zionalità italiana, con sede in Roma, viale Regina
Elena n.299,

a mezzo Mandatari: D.ssa Gemma Gervasi (N.238), Dr.
Diego Pallini (N. 484), Dr. Giorgio Moretti (N.206),
Dr. Angelo Passini (N. 73), Ing. Giorgio Coggi
(N.148), Dr. Livio Brighenti (N.475), D.ssa Maria
Vittoria Primiceri (N.465), D.ssa Raffaella Consuelo
Asensio (N.504), Dr. Giulio Mariani (N.329), di-
sgiuntamente, della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.a.,
Corso di Porta Vittoria n.9, Milano,

CHIEDE

che codesto Spettabile Ufficio provveda a trascrive-
re, a favore di essa richiedente, l'intervenuta ces-
sione,

da: BARBARA ENSOLI residente a Roma, via Festo Avieno
176 (CEDENTE),

a: ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' con sede a Roma,
Viale Regina Elena n.299 (CESSIONARIA),

relativamente al sottosegnato brevetto italiano:

- Domanda di brevetto per invenzione No. RM97A000743
depositata il 01.12.1997 ed avente titolo: "Tat di

HIV-1 o suoi derivati, da soli o in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate", nonché il relativo brevetto, ove già concesso;

Si allegano all'uopo:

- Copia autentica di atto di cessione, sottoscritto dalla CEDENTE personalmente dalla Sig.ra Barbara En-soli e sottoscritto per la CESSIONARIA dal Sig. Romano Rosario Di Giacomo, le cui firme sono state autenticate dal Dott. Giuliano Floridi, notaio in Roma in data 24.04.1998. Detto atto è stato registrato in data 12.05.1998, all'Ufficio del Registro di Roma.
- Attestazione di versamento di Lit. 120.000.= sul c/c postale 00668004 intestato all'Ufficio del Registro Tasse e Concessioni - ROMA.

- Lettera d'incarico.

Milano, li 03 Agosto 1998.

p. ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Il Mandatario


DR. DIEGO PALLINI

08-09-98 15:21

Da- NOTAR BARTOLO & GERVASI

3003825479828

T-556

F-980

PROF. DOTT. GIULIANO FERRI

Via Regina Elena n. 299
Tel. 4402690 - 4421593

Reg. n. 24

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

ATTO DI CESSIONE DI DOMANDA DI BREVETTO

TRA

Dott.ssa Barbara Ensoli, nata a Latina il
23.01.1960, cittadina italiana, residente in
Roma, via Festo Avieno 176, codice fiscale
n.NSLBBR60A63E472K nel seguito denominata per
brevità CEDENTE,

da una parte;

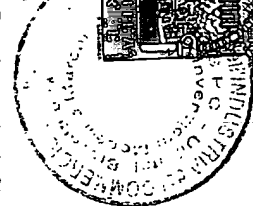
Istituto Superiore di Sanità, con sede in Roma,
viale Regina Elena n.299, C.F. num.80211730587 e
P.IVA num.03657731000, in persona del Dott. Romano
Rosario Di Giacomo, Dirigente Generale dei Servizi
Amministrativi dell'Istituto nato a Cassano IONIO
(CS) il 25.9.1937 nel seguito denominato per brevi-
tà CESSIONARIO,

dall'altra parte;

tra dette parti, ut sopra rappresentate, si convie-
ne e si stipula quanto segue:

Art.1

Il Cedente cede e trasferisce al Cessionario, il
quale accetta la proprietà piena ed esclusiva,
libera da ogni e qualsiasi vincolo reale di godi-
mento o garanzia, relativamente alla domanda di



REGISTRATO A ROMA
12-05-1998

AL N.

VOL.

INVENTORE

70000000

Brevetto italiano appresso specificata (nel seguito denominata BREVETTO):

- DOMANDA DI BREVETTO per invenzione industriale n.RM97AG000743 depositata l'1.12.1997 ed avente titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate".

Art.2

Il CEDENTE cede, altresì, al CESSIONARIO ogni diritto in ordine al deposito di domande di brevetto all'estero, che siano basate sul diritto di priorità unionista di cui all'art.4 della Convenzione dell'Unione di Parigi, relativamente al BREVETTO di cui all'art.1.

Art.3

Il BREVETTO viene trasmesso al CESSIONARIO nello stato di fatto e di diritto nel quale esso si trovava.

Il CESSIONARIO rinuncia ad ogni garanzia in ordine alla validità del BREVETTO ed alla non interferenza dello stesso con diritti di esclusiva appartenenti a terzi.

Art.4

Il CEDENTE s'impegna a sottoscrivere tutta la



documentazione necessaria per operare la trascrizione del presente Atto presso l'Ufficio Italiano Brevetti e Marchi in Roma. Detta trascrizione verrà svolta a cura e spese del CESSIONARIO.

Sono a carico del CESSIONARIO le spese di copia bollo e quelle per la registrazione fiscale del presente atto unitamente a quelle per l'autentica notarile delle firme del CEDENTE e del legale rappresentante del CESSIONARIO.

Art.5

Il corrispettivo per il BREVETTO trasmesso con il presente atto dal titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate" è pattuito in L.2.500.000.=(Duemilionicinquecentomila).

Tale somma verrà corrisposta dal CESSIONARIO mediante versamento sul c.c.b. n. 3886 cod. ABI

1005 - C.A.B. 03375, intestato alla D.ssa Barbara Ensoli presso la Banca Nazionale del Lavoro - sportello Istituto Superiore di Sanità - Roma.

Art.6

Il presente atto diverrà impegnativo per il CESSIONARIO solo dopo che siano intervenute le prescritte approvazioni e registrazioni di legge.

Letto, approvato e sottoscritto in duplice
originale, nel luogo e nella data qui in calce
riportati.

Roma. 24 - 06 - 98

Giuliano Floridi
N. Giacomo Romano Rosario

REPERTORIO N. 13436

AUTENTICA DI FIRMA

REPUBBLICA ITALIANA

Io sottoscritto dott. prof. Giuliano FLORIDI Notaio in Roma,
con studio al Viale Regina Margherita 239, iscritto nel Col-
~~legio Notarile dei Discreti Riuniti di Roma, Velletri e Ci-~~
vitavecchia, dichiaro e certifico vera ed autentica la firma
dei signori:

- Ensoli Barbara, nata in Latina il 23 gennaio 1960 e resi-
dente in Roma, via Feste Avieno n. 176, medico;

- Romano Rosario Di Giacomo, nato in Cassano Ionio (CS) il 25
settembre 1937 e domiciliato per la carica in Roma, viale Re-
gina Elena n. 299, medico;

dell'identità personale dei quali io notaio sono certo, hanno
firmato la scrittura che precede in mia presenza e previa lo-
ro espressa e concorde rinuncia, col mio consenso, all'assi-

08-08-88

15:22

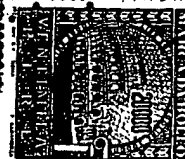
Da- NOTARBARTOLO & GERVAISI

+0039254179920

T-666

P. 18/08

T-000



senza dei testi.

Roma, al viale Regina Margherita 239, il ventiquattro aprile

millenovecentonovantotto.

F.to GIULIANO FLORIO - 1908

~~Il sottoscritto, in nome e per conto di legge~~

che si incarica per gli esecutori.

Roma, 3 giugno 1908



H 0 0 0 0 0



MINISTERO DELL'INDUSTRIA COMMERCIO ED ARTIGIANATO

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

ISTANZA DI CORREZIONE E INTEGRAZIONE

Oggetto: Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale n. RM97A000743 depositata il 01.12.1997 a nome Istituto Superiore di Sanità dal titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli o in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate."

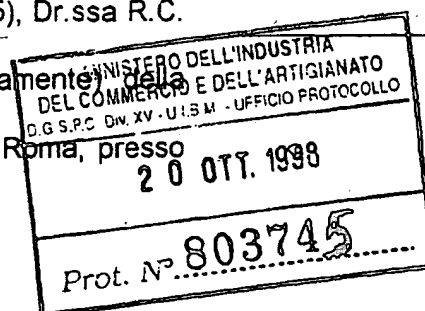
In base all'Art. 49 del DPR 22.06.79 n. 338 il sottoscritto Istituto Superiore di Sanità di nazionalità italiana con sede in Roma Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma, a mezzo mandatarî Dr.ssa Gemma Gervasi (n. 238), Dr. Diego Pallini (n. 484), Dr. Giorgio Moretti (n. 206), Dr. Angelo Passini (n. 73), Ing. Giorgio Coggi (n. 148), Dr. Livio Brighenti (n. 475), Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri (n. 465), Dr.ssa R.C.

Asensio (n. 504), Dr. G. Mariani (n. 329) (disgiuntamente) della

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A., Via Savoia, 82 - Roma, presso

cui elegge domicilio a tutti gli effetti di legge,

CHIEDE



che Codesto Spettabile Ufficio provveda ad apportare le seguenti correzioni ed integrazioni come dalle seguenti postille qui di seguito riportate:

Postilla 1: Pagina 1 della descrizione : Riga 16: dopo la parola "antivirale" inserire: "in presenza o meno di adiuvanti vaccinali".

Postilla 2: Pagina 1 della descrizione: Riga 17: dopo la parola

"mucosale" inserire la virgola e radiare "o".

Postilla 3: Pagina 1 della descrizione: Riga 19: dopo la parola "anti-CD28" **inserire:** ", e la veicolazione degli immunogeni con eritrociti o nanoparticelle".

Postilla 4: Pagina 12 della descrizione: Riga 11: dopo la parola "immunomodulante" **inserire:** "come l'IFN α o β ".

Postilla 5: Pagina 13 della descrizione: Dopo riga 16 andare a capo e **inserire:** "Studi recenti hanno dimostrato che la costimolazione di linfociti CD4+ con biglie paramagnetiche ricoperte con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 determina l'espansione logaritmica e policlonale dei linfociti provenienti da soggetti infetti con HIV [Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)] senza attivare la replicazione e la propagazione del virus. Questa attività antivirale è conseguente alla modulazione negativa dell'espressione di CCR5, il corecettore per i ceppi monocitotropi dell'HIV-1 [Carrol et al, Science. 276: 273-276, (1997)] e, in misura minore agli elevati livelli di chemochine indotti mediante costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 [Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)]. L'inventore ritiene che la possibilità di espandere linfociti autologhi da soggetti

infettati con HIV in assenza di replicazione/propagazione virale consente di approntare un efficace immunizzazione ex vivo, descritto negli esempi, che può essere di grande utilità nell'allestimento di un vaccino anti-Tat".

Postilla 6: Pagina 14 della descrizione: dopo riga 12 andare a capo e inserire." In particolare, l'inventore ritiene che l'uso di batteri (*Streptococcus gordonii* e *Lactobacillus*) "ingegnerizzati" ad esprimere gli antigeni virali sopra menzionati possa essere una valida strategia per indurre e/o potenziare una risposta immune specifica a livello delle mucose nella scimmia e nell'uomo. Questi batteri sono infatti in grado di colonizzare la mucosa orale e vaginale nei topi, e di indurre una risposta anticorpale specifica locale e sistemica nei confronti degli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti [Oggioni et al., *Vaccine* 13: 775 (1995); Medaglini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6868 (1995); Medaglini et al., *Vaccine* 15:1330 (1997); Pozzi et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 35 (1997); Oggioni, et al., *Gene* 169:85 (1996); Rush, et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 107 (1997); Medaglini et al., *Biothec. Annu. Rev.* 3:297 (1997); Medaglini et al., *Am. J. Reprod. Immunol.* 39:199 (1998)]. Infine, questi batteri funzionano come vettori vivi di vaccini, ed hanno il vantaggio di offrire una stimolazione prolungata del sistema immunitario.

Inoltre, l'inventore ritiene che anche vettori virali ricombinanti del virus herpes simplex di tipo 1 (HSV-1), non replicativi, apatogeni [Marconi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 93:11319 (1996)], potranno essere utilizzati per esprimere proteine virali per l'induzione di una risposta sistemica (mediante immunizzazione cutanea, i.d.) e mucosale (per via orale,

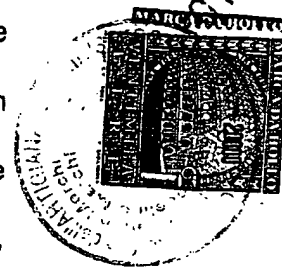
vaginale o nasale). Infatti, si sfrutterebbe l'abilità di questi vettori di contenere estese sequenze esogene senza interferire nell'efficienza d'infezione [Glorioso et al., Ann. Rev. Microbiol. 49:675 (1995); Huard et al. Gene Ther. 2:385 (1995)]. Si potrebbero costruire vettori capaci di contenere più geni di HIV (regolatori, accessori e strutturali). I vettori erpetici possono inoltre essere interessanti per la possibilità di somministrazione per via orale, nasale o vaginale data la possibilità di HSV-1 di essere somministrato in modo diretto per via mucosale [Bowen et al., Res. Virol. 143:269 (1992); Kuklin et al., J. Virol. 240:245 (1998)].

L'inventore ritiene che Tat (proteina e/o DNA) da sola o in combinazione con gli altri immunogeni sopra descritti possa essere inoculata utilizzando nuovi sistemi di delivery, quali eritrociti o nanoparticelle. In particolare, ritiene che sia possibile veicolare antigeni legati sulla membrana di eritrociti autologhi [Magnani et al.,

Biotech. Appl. Biochem. 16:188 (1992) and 20:335 (1994)]. Poiché gli eritrociti, alla fine della loro vita (nell'uomo 120 giorni), sono rimossi dal circolo dalle cellule del sistema macrofagico, notoriamente professioniste della presentazione dell'antigene, questa proprietà

potrebbe essere opportunamente sfruttata a scopi vaccinali. Infine, un'ulteriore strategia di delivery può essere rappresentata dalle nanoparticelle. Nanoparticelle funzionali rappresentano sistemi estremamente interessanti per il trasporto ed il rilascio controllato di proteine e DNA [Chavany et al., Phar. Res. 9: 441 (1994); Zobel et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 483 (1997)] in quanto possono

H 02.03.99



essere realizzate con elevato grado di affinità nei confronti di queste molecole biologicamente attive. Le nanosfere sono particelle polimeriche colloidali, di differente composizione chimica, variabili in grandezza da 10 a 1000 nm. Alla superficie, o al loro interno, è possibile adsorbire sostanze di diversa natura (oligonucleotidi, farmaci, proteine, peptidi, DNA) che vengono in tal modo veicolate nel citoplasma o nel nucleo della cellula dove sono rilasciate gradualmente. Queste proprietà, inoltre, permettono di utilizzare quantità estremamente basse di sostanza. Le nanoparticelle costituiscono quindi un ottimo sistema di delivery soprattutto per quelle sostanze che, per loro natura, sarebbero instabili nell'ambiente intracellulare o di cui si voglia aumentarne l'efficacia o la veicolazione verso cellule specifiche." e radiare da riga 13 di pagina 14 a riga 2 di pagina 15 della descrizione.

Postilla 7: Pagina 15 della descrizione: Riga 5: dopo la parola "parti" inserire: "in presenza o meno di adiuvanti vaccinali".

Postilla 8: Pagina 15 della descrizione: Riga 23: **sostituire:** "Rivendicazioni" con "Sommario dell'Invenzione".

Postilla 9: Pagina 17 della descrizione: Riga 19: dopo "CD28" aggiungere ",eventualmente coniugati a biglie paramagnetiche".

Postilla 10: Pagina 17 della descrizione: dopo Riga 21: **andare a capo e inserire:** "11. un vaccino, come descritto nei punti precedenti, in combinazione con gli adiuvanti che ne potenzino la risposta immune.

12. un vaccino, come descritto nei punti precedenti, somministrato in associazione a sistemi di veicolazione e di rilascio (delivery systems), da solo o in combinazione, quali nanoparticelle, vettori erpetici, globuli rossi, batteri e, comunque, ogni sistema di delivery con i quali il vaccino sopra descritto, in tutte le sue combinazioni, potrà essere somministrato.”.

Postilla 11: Pagina 19 della descrizione: dopo Riga 10: **inserire:** “A

tale proposito, per inibitori della replicazione virale intendiamo tutte le molecole, conosciute attualmente o quelle che verranno in seguito scoperte (inibitori nucleosidici e non nucleosidici della trascrittasi inversa, inibitori delle proteasi, RNA antisense e, in genere, tutte le molecole in grado di bloccare l'espressione dei geni di HIV) in grado di limitare o bloccare la replicazione di HIV.

Come accennato precedentemente, si descrivono differenti metodi di immunizzazione che prevedono l'utilizzo di Tat in associazione con altri geni o proteine virali, o parti di essi, o geni o proteine di citochine immunomodulatrici, o parti di essi. Per “parti di essi” (o “parti di esse”) si intendono segmenti dei geni o delle proteine sopracitati, dei quali (o delle quali) si dimostri l'efficacia nell'indurre gli stessi effetti

immunogenici del gene o della proteina interi.

Inoltre, poiché è nota l'efficacia degli adiuvanti nelle strategie vaccinali, la presente invenzione si riferisce all'utilizzo degli adiuvanti conosciuti e di quelli che verranno scoperti in futuro, somministrati insieme a Tat (proteina o DNA) e alle combinazioni di Tat e altri geni o proteine virali o cellulari. Analogamente, viene ipotizzata l'efficacia dei differenti

sistemi di veicolazione e di rilascio (delivery systems) di Tat (proteina o DNA) e delle combinazioni di Tat e altri geni o proteine virali o cellulari, sia nell'induzione di un'immunità generale che di un'immunità locale verso Tat (immunizzazione mucosale).

Risultati ottenuti dall'autore e non ancora pubblicati, indicano che solo la proteina Tat nella sua forma biologicamente attiva è in grado di legare specifici recettori cellulari e di entrare nella cellula. Tale proprietà è alla base della risposta immune da parte delle cellule accessorie e delle cellule immunitarie in genere e, secondo l'autore, è fondamentale nell'indurre una risposta immune molto più forte di quella che la proteina inattiva sia in grado di stimolare. In conclusione, a differenza dell'utilizzo di Tat inattivato come immunogeno, proposto da alcuni ricercatori, si intende utilizzare Tat di HIV-1, o suoi mutanti, nella sua forma biologicamente attiva per indurre una forte risposta immune verso l'HIV in grado di prevenire l'infezione o la malattia e per attuare strategie terapeutiche efficaci negli individui infettati da HIV-1. Il vaccino secondo l'invenzione può essere veicolato per via sistemica (intramuscolare, intradermica, sottocute, etc) o locale (mucosale).

Questa via è preferita quando si utilizzano come delivery systems i

batteri di cui si dirà appresso. Il principio attivo del vaccino può essere preparato come liofilo ed essere immagazzinato. Quindi, per l'uso, può essere risospeso in siero autologo.

Fanno parte della presente invenzione le cellule trasformate comprendenti un vettore esprimente Tat o suoi mutanti o sue parti

come detto nella descrizione, cellule che vengono coltivate per esprimere la proteina Tat, che a sua volta viene isolata per l'uso.

Si intende che nell'ambito della presente invenzione sono ricomprese tutte quelle varianti di Tat di qualsiasi tipo o sottotipo di HIV che abbiano attività almeno analoga a quella descritta."

Postilla 12: Pagina 20 della descrizione: Riga 7: **sostituire:** "10 o con 100 µg" con: "100 (M1) e 10 (M2) µg".

Postilla 13: Pagina 20 della descrizione: Riga 9: dopo la parola "inoculata" inserire: "(M3)" e andare a capo.

Postilla 14: Pagina 20 della descrizione: Riga 10: dopo "22" radiare "e 27 settimane" e aggiungere: ", 27, 32, 37 settimane. La ricerca degli anticorpi era effettuata anche alla settimana 41 per la scimmia M2, inoculata con 10 µg di proteina Tat, e la scimmia M3."

Postilla 15: Pagina 20 della descrizione: Riga 11: **sostituire** la parola "plasmidi" con "sieri".

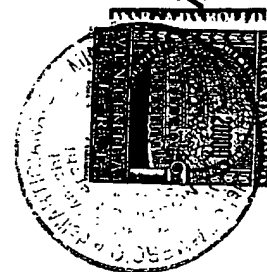
Postilla 16: Pagina 20 della descrizione: Riga 15: radiare: " PBS A 1x" e **sostituire con:** "PBS senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (PBS-A)".

Postilla 17: Pagina 21 della descrizione: Riga 3: dopo "1:50" inserire: "e 1:100".

Postilla 18: Pagina 21 della descrizione: Riga 4: **sostituire:** "(± S.D.)" con: "+ 3 Deviazione Standard (S.D.)".

Postilla 19: Pagina 21 della descrizione: Riga 6: dopo la parola "campione" aggiungere: "diluito 1:50".

H 02.03.99



Postilla 20: Pagina 21 della descrizione: Riga 7: dopo la parola "pozzetti" **radiare:** ",sottratti del valore del cut off \pm S.D. (Δ OD405)," e inserire il punto.

Postilla 21: Pagina 21 della descrizione: Riga 8: dopo ">2,7" aggiungere: "indica che".

Postilla 22: Pagina 21 della descrizione: Riga 10: dopo la parola "Titolazione" **radiare:** "dei plasmi delle scimmie inoculate con 100 e 10 μ g di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2." E **inserire:** "degli anticorpi anti-Tat nei sieri delle scimmie inoculate con 100 (M1) e 10 (M2) mg di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2. Il saggio ELISA era eseguito come descritto nella figura 2. In questo caso i sieri delle scimmie erano saggiati (in doppio) diluiti scalarmente da 1:50 a 1:25.600."

Postilla 23: Pagina 21 della descrizione: Riga 13: dopo le parole "cut off" **inserire:** "relativo a ciascuna diluizione. Il valore di cut off calcolato per ciascuna diluizione corrispondeva alla media +3 S.D. delle letture dei sieri prelevati al tempo 0 di tutte le scimmie ottenute in tutti gli esperimenti."

Postilla 24: Pagina 21 della descrizione: dopo Riga 13, andare a capo e : **inserire:** " **FIGURA 4.** Mappatura degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi IgG anti-Tat delle scimmie inoculate con 100 (M1) e 10 (M2) μ g di proteina Tat ricombinante, descritte nella figura 2. Per mappare gli epitopi riconosciuti dagli anticorpi anti-Tat, sono stati eseguiti saggi ELISA utilizzando 8 peptidi sintetici, corrispondenti agli aminoacidi (aa)

di Tat 1-20, 21-40, 36-50, 46-60, 52-72, 56-70, 65-80 e 73-86. 100 µl di ciascun peptide (alla concentrazione di 10 µg/ml in PBS-A/0.1% BSA) erano adsorbiti a ciascun pozzetto in piastre da 96 di PVC per 12 ore a 4° C. Le piastre erano successivamente lavate ed incubate con 100 µl di PBS-A/3% BSA per 2 ore a 37° C, lavate 3 volte con PBS-A/Tween 0.05% ed incubate con 50 µl per pozzetto dei sieri diluiti in PBS-A/3% BSA. Il saggio era quindi eseguito come descritto nella figura 2. I sieri erano prelevati alla 37^a settimana dall'inizio della vaccinazione. I valori di cut off, calcolati per ciascun peptide e per ogni diluizione, corrispondono alla media +3 S.D. della lettura dei sieri prelevati al tempo 0 di tutte le scimmie ottenute in tutti gli esperimenti. (A) Riporta i risultati, relativi ai sieri diluiti 1:50 e a ciascun peptide, che corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture di due pozzetti; (B) riporta i risultati relativi alla titolazione dei sieri mostrati in (A) e sono rappresentati in ordinata come il reciproco della diluizione più alta di siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off relativo a ciascuna diluizione. “.

Postilla 25: Pagina 21 della descrizione: Riga 14: sostituire “4” con “5”.

Postilla 26: Pagina 21 della descrizione: Riga 22: Dopo la parola “settimane.” **Inserire:** “La ricerca degli anticorpi era valutata alle settimane 2, 6, 11 e 15. L'esecuzione dei saggi ELISA è descritto nella figura 2. “ e **radiare** da “L'esecuzione” a “figura 2.”.

Postilla 27: Pagina 22 della descrizione: Riga 3: dopo il valore "1:1000." **Aggiungere:** "Il valore di cut off era calcolato come la media (+ 2 S.D.) delle letture dei sieri di tutte le scimmie, prelevati al tempo 0. I risultati riportati nell'istogramma relativi a ciascun campione corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture dei due pozzetti, sottratti del valore di cut off (ΔOD_{405}).".

Postilla 28: Pagina 22 della descrizione: Riga 4: **sostituire:** "5" con "6" e dopo la parola "umorale" **radiare** "del" e **inserire:** "anti-Tat specifica di" e **radiare:** "specifica anti-Tat".

Postilla 29: Pagina 22 della descrizione: Riga 5: dopo "con" **radiare:** "Tat" e **aggiungere** "proteina Tat ricombinante".

Postilla 30: Pagina 22 della descrizione: Riga 11: dopo "6,11" **radiare:** "e 15" e "riga 12 e 13" e **inserire:** "15, 21, 28 e 32 settimane. Alla 36^a settimana le scimmie M1-M6 erano inoculate con 15 μ g di proteina Tat risospesa in 200 ml di Iscom e 300 ml di PBS. La ricerca degli anticorpi era valutata anche alla settimana 40 e 44. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. I risultati riportati in figura sono relativi ai campioni diluiti 1:50. >2,7

indica che i valori di lettura erano fuori scala.".

Postilla 31: Pagina 22 della descrizione: Riga 14: **sostituire** "6" con "7" e dopo la parola "Titolazione" **radiare:** "dei sieri delle scimmie inoculate con la" e **inserire:** "degli anticorpi anti-Tat nei sieri delle scimmie inoculate con la proteina".

Postilla 32: Pagina 22 della descrizione: Riga 16: dopo "(M4-6)" aggiungere: "descritti nella figura 6".

Postilla 33: Pagina 22 della descrizione: Riga 18: dopo le parole "cut off" aggiungere: "calcolato per ciascuna diluizione, come descritto nella figura 3."

Postilla 34: Pagina 22 della descrizione: dopo Riga 18 andare a capo e inserire: "**FIGURA 8.** Mappatura degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi IgG anti-Tat delle scimmie inoculate con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6), descritti nella figura 6. I sieri erano prelevati alla 21^a settimana dall'inizio della vaccinazione. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 4. I risultati riportati nell'istogramma (A) sono relativi ai campioni diluiti 1:50 e a ciascun peptide e corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture di due pozzetti. I risultati raffigurati nell'istogramma (B) sono relativi alla titolazione dei sieri mostrati in (A) e sono rappresentati in ordinata come il reciproco della diluizione più alta di siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 9. Analisi della presenza di una risposta CTL specifica anti-Tat. Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 5. Nella figura è riportato un esempio relativo alla 36^a settimana della scimmia M1, inoculata per via sottocutanea con 10 µg della proteina Tat e RIBI, descritta nella figura 6. I quadrati (controllo) corrispondono alle cellule incubate con la linea bersaglio Bcl non pulsata con il Tat; i rombi

H 02.03.88

corrispondono alle cellule incubate con la linea bersaglio Bcl pulsata con il Tat (1 mg / 250.000 cellule).".

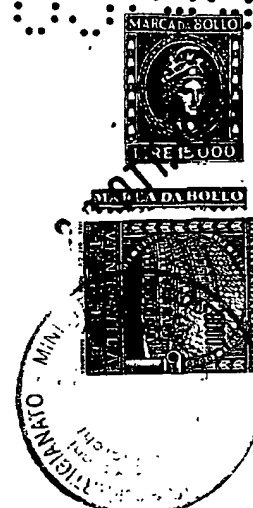
Postilla 35: Pagina 22 della descrizione: Riga 19: sostituire "7" con "10".

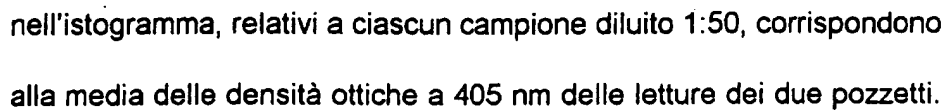
Postilla 36: Pagina 22 della descrizione: Riga 21: dopo "BSA" radiare "e" e inserire "oppure".

Postilla 37: Pagina 23 della descrizione: Riga 2: dopo "M2" aggiungere ", inoculata con 10 µg della proteina Tat e RIBI e descritta nella figura 6,".

Postilla 38: Pagina 23 della descrizione: Dopo Riga 4 andare a capo e inserire: "**FIGURA 11.** Risposta umorale di tipo IgG specifica anti-Tat in una scimmia (M1) inoculata con 200 µg di DNA, del plasmide PCVTat risospeso in 150 µl di PBS-A, per via intradermica in 2 siti vicini ai linfonodi ascellari; una scimmia (M2) inoculata con 500 mg di PCVTat, risospeso in 250 µl di PBS-A, per via intramuscolare in 2 siti nel dorso; la scimmia di controllo (M3) non era inoculata, ma riceveva come controllo di specificità ripetuti skin tests con Tat. Le scimmie erano inoculate con PCVTat al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22, 27, 32 e

37 settimane. Infine, dopo 42 settimane le scimmie ricevevano un richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 µg) risospesa in 200 µl di Iscom e 300 µl di PBS. La ricerca degli anticorpi era valutata alle settimane 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48 e 58. La presenza della risposta anticorpale anti-Tat nei sieri degli animali era analizzata mediante saggi ELISA, come descritto nella figura 2. I risultati riportati





(A) Riporta i risultati ottenuti dalle due scimmie vaccinate con 200 (M1) e 500 (M2) μg di DNA del plasmide pCVTat. (B) Riporta i risultati relativi alla scimmia di controllo (M3) non inoculata.

FIGURA 12. Titolazione degli anticorpi anti-Tat nel siero della scimmia M2 inoculata per via intradermica con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat. L'esecuzione del saggio ELISA è descritta nella figura 2. I risultati in ordinata sono rappresentati come il reciproco della diluizione più alta del plasma che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off relativo a ciascuna diluizione.

FIGURA 13. Analisi della risposta umorale di tipo IgG specifica anti-Tat in tre scimmie (M9-11) inoculate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e in una scimmia di controllo (M12) inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. Il DNA era risospeso in 1 ml di PBS-A ed inoculato per via intramuscolare in 2 siti nel dorso. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 6, 11, 15, 21, 28 e 32 settimane. Alla 36^a settimana le scimmie M9-M11 ricevevano una ~~inoculazione di richiamo con 15 µg di proteina Tat ricombinante~~

risospesa in 200 μ l di Iscom e 300 μ l di PBS. La presenza di anticorpi anti-Tat era ricercata alle settimane 2, 6, 11, 15, 21, 28, 32, 36, 40, e 44. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2."

Postilla 39: Pagina 23 della descrizione: Riga 5: **sosituire “8” con “14”.**

Postilla 40: Pagina 23 della descrizione: Riga 9: **radiare**: "metodiche immunomagnetiche" e **sostituire con** "biglie paramagnetiche".

Postilla 41: Pagina 23 della descrizione: Riga 10: **radiare** la parola "parte" e **sostituire con** "metà".

Postilla 42: Pagina 23 della descrizione: Riga 11: **radiare** la parola "parte" e **sostituire con** "metà".

Postilla 43: Pagina 23 della descrizione: Riga 17: **sostituire** "9" con "15".

Postilla 44: Pagina 23 della descrizione: Riga 19: dopo la parola "ottenuti" **radiare da** "con le metodiche ... " **fino a** "nell'esempio 5." e **inserire** "da 4 scimmie con la procedura descritta nella figura 14, venivano stimolati come riportato nell'Esempio 7.".

Postilla 45: Pagina 24 della descrizione: Riga 1: **sostituire** "5" con "7" e **inserire**: "**FIGURA 16** Caratterizzazione funzionale di cellule dendritiche (DC) ottenute dal sangue periferico di scimmie. A. Incorporazione di timidina tritiata al giorno 4 di coltura mista leucocitaria allogeneica (AMLR): comparazione della funzione di presentare l'antigene (APC, misurata come induzione della

proliferazione di cellule T allogeneiche) tra DC e macrofagi (Mø) ottenuti da PBMC di sangue periferico di *Macaca fascicularis* dopo separazione su gradiente di Percoll e aderenza su plastica. Le cellule non aderenti erano rimosse e quelle aderenti erano indotte a maturare in DC con l'aggiunta di GM-CSF (200 ng/ml) e IL-4 (200 U/ml) ogni 3 giorni. La metà del terreno di coltura (RPMI 10% FCS) veniva poi

rimossa e sostituita con terreno fresco ogni 3 giorni. Dopo 6-7 giorni di coltura si osservava un cambiamento morfologico nelle cellule indotte con citochine che acquisivano l'aspetto tipico delle DC (perdita dell'aderenza, clusterizzazione, propaggini), anche verificato con l'ausilio di marcatori di membrana tipici (dati non mostrati). Le cellule monocitarie non venivano indotte con citochine ed erano coltivate nel medesimo terreno con cambi del sovranoatante effettuati ogni 3 giorni. Tali cellule mantenevano le caratteristiche monocito-macrofagiche, quali l'aderenza. Al 7° giorno entrambe le popolazioni cellulari erano cimentate con linfociti T provenienti da un donatore umano, purificati tramite gradiente di Ficoll e Percoll ed aderenza, ed in seguito congelati.

Il test di proliferazione cellulare di linfociti T umani eseguito con DC o Mø di scimmia era eseguito in piastra da 48 pozzetti. 0.5×10^6 linfociti T erano stimolati con 5000 DC o Mø (Rapporto T:APCs = 100:1). La coltura era mantenuta per 4 giorni, e aliquote fisse della sospensione cellulare erano poi trasferite in piastre da 96 pozzetti in triplicato a cui veniva aggiunto $1 \mu\text{Ci}$ per pozzetto di timidina tritiata per 16 ore. Al termine dell'incubazione, le conte per minuto (cpm) emesse dal

marcatore radioattivo incorporato dalle cellule erano ottenute tramite lettura con un contatore a scintillazione.

B. Le cellule presentanti l'Ag (APCs) quali DC e Mø, ottenute con le medesime modalità riportate in figura 16A, erano cimentate con linfociti T di un'altra scimmia, ottenuti come riportato nell'esperimento precedente per il donatore umano, per verificare la maggiore capacità

H 02.03.99

di presentare l'Ag che è la caratteristica tipica delle DC rispetto ai Mø.

In questo caso le APCs erano aggiunte a concentrazioni scalari ai linfociti T in modo da valutare le risposte proliferative ottenute a vari rapporti linfociti T:APCs (DC o Mø). “.

Postilla 46: Pagina 40 della descrizione: Ultima Riga: dopo la parola

“specifica” inserire “ed efficacia protettiva della immunizzazione al challenge virale”.

Postilla 47: Pagina 41 della descrizione: Riga 2: dopo la parola

“cellulare)” inserire: “e protettiva al challenge virale”.

Postilla 48: Pagina 41 della descrizione: Riga 14: dopo la parola

“abbiamo” radiare da “inoculato...” a “non inoculata.” e inserire:

“valutato la tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare). Pertanto 3 scimmie

sono state inoculate secondo il seguente schema: la scimmia 1 (M1) è

stata inoculata con la proteina Tat ricombinante (100 mg), risospesa in

250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, per via sottocutanea in un

sito; la scimmia 2 (M2) è stata inoculata con la proteina Tat

ricombinante (10 mg), risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml

di RIBI, per via sottocutanea in un sito; e la scimmia 3 (M3) è la

scimmia di controllo non inoculata.”.

Postilla 49: Pagina 41 della descrizione: Ultima riga: dopo il valore

“22,” radiare “e 27 settimane.” e inserire “27, 32 e 37 settimane. Il

protocollo di immunizzazione è stato interrotto alla settimana 37 per la

scimmia M1 e alla settimana 41 per la scimmia M2. Gli animali sono



stati sacrificati per lo studio di parametri immunologici in diversi organi e tessuti (milza e linfonodi), quali la determinazione dell'attività proliferativa al Tat, dell'attività CAF e della presenza di CTL. Per attività CAF si intende l'attività antivirale mediata dalle cellule CD8+, non MHC-ristretta, né citolitica."

Postilla 50: Pagina 42 della descrizione: Riga 6: **radiare:** "IL-15".

Postilla 51: Pagina 42 della descrizione: Riga 8: **radiare:** "e CD45RO".

Postilla 52: Pagina 42 della descrizione: Riga 9: dopo la parola "attività" **radiare:** da "CTL e NK..." a "(CAF). e **inserire:** "citotossica specifica (CTL), la presenza di attività antivirale CAF e la presenza di attività antivirale totale (TAA) mediata dai PBMC e dal siero autologo."

Postilla 53: Pagina 42 della descrizione: Riga 13: **radiare** da: "Questo esperimento" a "non inoculata" di pagina 45 della descrizione e **inserire** "I risultati di questo esperimento sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che la proteina Tat era

~~ben tollerata dagli animali e non era tossica nelle dosi somministrate,~~
utilizzando la via di inoculazione scelta. Nelle scimmie M1 e M2 erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 5^a settimana dopo la prima inoculazione. Alla 37^a settimana IgG anti-Tat erano evidenziabili alla diluizione di 1:6400 nel plasma di entrambe le scimmie e, alla 41^a settimana, alla diluizione di 1:12.800 nel plasma

della scimmia M2. I risultati sono riportati nelle figure 2 e 3. Nella scimmia di controllo M3 erano evidenziabili anticorpi anti-Tat a basso titolo probabilmente elicitati dalle ripetute inoculazioni di piccole quantità di Tat per l'esecuzione dello skin test effettuata in questa scimmia come controllo di specificità. Nelle scimmie M1 ed M2, gli anticorpi anti-Tat erano diretti principalmente contro la regione amino terminale (aa 1-20) di Tat, con un titolo di 1:3200 (figura 4). Nella scimmia M2, inoculata con 10 µg di Tat, erano evidenziati anche anticorpi diretti contro i peptidi corrispondenti agli aa 36-50 e 46-60 di Tat, con titoli di 1:50 e 1:100 rispettivamente (figura 4). L'attività neutralizzante il Tat del siero delle scimmie vaccinate veniva saggiata mediante saggi di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come precedentemente descritto [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1 e M2, diluiti 1:2 e ottenuti alla 27^a settimana dal primo inoculo, erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel sopranatante delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) non aveva attività

bloccante verso il Tat (Tabella 4).

TABELLA 4

Attività neutralizzante dei sieri sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare^a

Campioni	Inibizione (%)
Tat (30 ng/ml) + Siero preimmune M1	0
Tat (30 ng/ml) + Siero preimmune M2	0
Tat (30 ng/ml) + Siero immune M1	79,12
Tat (30 ng/ml) + Siero immune M2	100

**L'attività neutralizzante dei sieri è stata determinata in cellule HLM-1 (cellule HeLa contenenti integrata una copia del provirus HIV-1 difettivo del gene tat). Cellule HLM-1 sono state piastrate alla concentrazione di 6×10^5 cellule per pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37° C per 16 ore. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0.1%, ed incubate per 48 ore con terreno di crescita (0.3 ml) a cui veniva aggiunta la proteina Tat ricombinante in presenza di un ugual volume di sieri delle scimmie prelevati al tempo 0 (preimmuni) o alla 27ª settimana (immuni). I controlli negativi erano rappresentati dalle cellule trattate solo con un pool dei sieri preimmuni, immuni, o con PBS contenente BSA allo 0.1% (PBS + 0.1% BSA) ma in assenza di Tat. Per tutti questi controlli non si sono osservati effetti sul rescue virale. Ogni campione è stato saggiato in doppio. Sui supernatanti cellulari era quindi ricercata la presenza di virus rilasciato dalle cellule mediante determinazione dei valori di antigene p24 Gag, utilizzando un kit commerciale p24 antigene capture - Elisa (Nen Dupont). I risultati sono espressi come percentuale di inibizione del rescue virale [misurato come la media della p24 (pg/ml) in 2 pozzetti per campione] ottenuto con i sieri immuni rispetto ai sieri*

preimmuni (0 % di inibizione). Le scimmie M1 e M2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 mg o 10 mg, rispettivamente) risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito del dorso in prossimità dei linfonodi ascellari. I risultati dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat alla 22ª settimana (Tabella 5) nelle scimmie inoculate con la proteina Tat,

H 02.03.99

essendo maggiore nella scimmia M2 che riceveva ad ogni inoculazione 10 mg di proteina Tat ricombinante.

TABELLA 5

Risposta proliferativa al Tat ^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dall'inizio della immunizzazione				
		15	22	27	32	37
M1	PHA	15,3	13,9	19,9	40,6	3,2
	TT	1,2	4,7	2,1	3,8	2
	Tat	0,8	2,4	1,1	1,3	0,6
M2	PHA	8,1	11,6	17,1	16,8	1,7
	TT	2	3,8	1,7	1	0,6
	Tat	0,9	3	1,4	1,2	0,6
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6
	Tat	2,1	1,4	1,3	0,7	0,9

^aLinfociti di sangue periferico isolati mediante gradiente di Ficoll e seminati a 2×10^5 cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96 pozzetti, erano cresciuti in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e stimolati con Tat (1 o 5 mg/ml), PHA (4 mg/ml), o il tossoide del tetano (TT) (10 mg/ml), contro cui tutti le scimmie erano vaccinate.

Campioni di controllo non stimolati erano incubati solo con il terreno di crescita. L'incremento della proliferazione cellulare era determinata al 5° giorno con saggio di incorporazione di timidina triziata come descritto

[Ensoli et al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241

(1988); Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)]. I risultati sono riportati come indice di stimolazione calcolato secondo la seguente formula: media dei cpm del campione/media dei cpm dei controlli. Sono considerati positivi i valori superiori a 2. Le scimmie M1 e M2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 mg o 10 mg, rispettivamente) risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI,

ed inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia M3 è una scimmia di controllo non inoculata.

I risultati riportati in Tabella 6 indicano l'assenza di linfociti T citotossici (CTL) nelle scimmie M1 e M2 vaccinate con la proteina Tat ricombinante.

TABELLA 6

*Analisi dell'attività citotossica specifica per Tat (CTL)**

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Attività CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,12 5	Media	
M1	41	0	0	0	0	0	0	-
M2	41*	0	0	0	0	0	0	-
M3	41	0	0	0	0	0	0	-

* Gli effettori erano preparati come segue. I PBMC erano purificati in gradiente di Ficoll, risospesi alla concentrazione di 1×10^7 cellule/ml in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino ed incubati in piastre da 24 pozzetti (500 μ l per pozzetto) per 12 ore a 37° C in assenza o in presenza della proteina Tat (1 μ g/pozzetto). Il giorno successivo le cellule coltivate in assenza di Tat erano centrifugate a 1500 rpm, risospese in 50 μ l di RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino, incubate per 3 ore a 37° C in presenza di Tat (1 μ g), lavate ed infine risospese in 500 μ l di terreno ed aggiunte alle cellule coltivate dal giorno precedente in presenza di Tat. Dopo ulteriori 24 ore, le cellule erano diluite con 1 ml di terreno completo contenente IL-2, alla concentrazione finale di 2 U/ml, e cresciute a 37° C per 14 giorni. Le cellule bersaglio (BICI) erano rappresentate da linee primarie di

linfociti B autologhe, preparate per ciascuna scimmia prima di iniziare la vaccinazione. A questo scopo i PBMC, prelavati al giorno -35 e purificati mediante gradiente di Ficoll, erano coltivati alla concentrazione di 3×10^5 cellule per pozzetto in piastre da 96 in presenza del 50% di terreno derivato da una linea che produce Papiovirus, descritta precedentemente [Chen et al., J. Immunol. 149:4060 (1992)], per due o tre settimane. Una decina di linee B erano ottenute per ciascun animale, espanse e congelate. Per il saggio di tossicità era utilizzato il kit Delfia Cytotoxicity Test (Wallac, Turku, Finland) che sfrutta il principio della "time-resolved fluorescence" [Blomberg et al., J. Immunol. Methods 160:27-34 (1993); Blomberg et al., J. Immunol. Methods 168:267-273 (1994); Blomberg et al., J. Immunol. Methods 193: 199-206 (1996)]. A tale scopo, le Bcl erano coltivate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/200 μ l di terreno contenente il 10% di siero fetale bovino in assenza o in presenza della proteina Tat (4 μ g), per 12 a 37° C. Le Bcl, erano quindi lavate, risospese in 1 ml di terreno contenente il 10% di siero fetale bovino ed incubate per 15 min a 37° C in presenza di 5 μ l di fluorescence enhancing ligand, fornito dal kit.

~~Dopo cinque lavaggi, le cellule Bcl erano risospese alla concentrazione~~
 di 5×10^4 /ml, immediatamente centrifugate a 1800 rpm per prelevare il surnatante che successivamente serviva per determinare il valore di background. I PBMC (effettori) erano seminati (in doppio) alla concentrazione di 2.5×10^4 cellule/100 μ l in terreno contenente IL-2 ed opportunamente diluiti in piastre da 96 pozzetti a cui venivano aggiunti 5×10^3 cellule bersaglio/100 μ l (coltivate in presenza o in assenza di Tat).

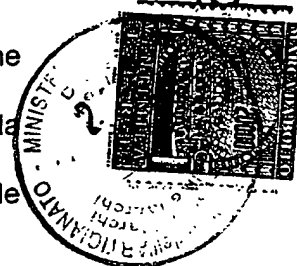
H 02.03.99

I rapporti cellule bersaglio/effettori erano 1:50, 1:25, 1: 12.5, 1:6.25, 1: 3.125. I PBMC a cui erano state aggiunte le cellule bersaglio (pulsate o non pulsate con il Tat) erano incubati per 2 ore a 37° C con: 1) 20 µl di Triton al 5% , per determinare il massimo rilascio; 2) con 100 µl di terreno, per determinare rilascio spontaneo; 3) 200 µl del terreno della cellule bersaglio, per determinare il valore di background. Al termine dell'incubazione, le piastre erano centrifugate, 20 µl di ciascun supernatante erano trasferiti in una nuova piastra ed incubati per 20' con 200 µl di una soluzione contenente europio e fornita dal kit. I campioni erano letti al citofluorimetro (Victor, Wallac, Turku, Finland). L'attività CTL specifica era valutata con la seguente formula: Rilascio specifico % = $\frac{[(\text{Media delle letture} - \text{Background}) - (\text{Rilascio spontaneo} - \text{Background})]}{[(\text{Rilascio massimale} - \text{Background}) - (\text{Rilascio spontaneo} - \text{Background})]} \times 100$. Il saggio era considerato positivo quando la media delle differenze alla varie concentrazioni di effettori era superiore al 4%. Il 4% è un valore arbitrario stabilito sulla base di saggi di controllo effettuati in precedenza. ND, non determinato. Le scimmia M2 era inoculata con la proteina Tat ricombinante (10 mg) risospesa in ~~250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, ed inoculata per via~~ sottocutanea in un sito. La scimmia M3 è una scimmia di controllo non inoculata.

* I linfociti erano isolati dai linfonodi periferici quando la scimmia M2 è stata sacrificata.

I risultati inoltre dimostrano la presenza di attività antivirale solubile mediata dai linfociti T CD8+ (CAF) alla 22^a, 27^a e 37^a settimana,

H 02.03.99



valutata come la capacità dei supernatanti dei linfociti T CD8+ delle scimmie di inibire l'infezione acuta nelle cellule CEM x 174 infettate con il virus chimerico SHIV 89.6P o di controllare la riattivazione dell'infezione cronica nelle cellule OM-10-1 cronicamente infettate da HIV-1 (Tabella 7). In generale si osserva un'attività CAF maggiore nelle scimmie vaccinate rispetto al controllo.

TABELLA 7

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8+ (CAF)^a

N° scimmia	Settimana dall'inizio dell'immunizzazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M1	22	89.5	ND
	27	62	61,7
	37	ND	ND
M2	22	44	ND
	27	54	27
	37	48	53
M3	22	24	ND
	27	37	22
	37	75	23

^aCellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) erano isolate mediante gradiente di Ficoll dalle scimmie immunizzate con 100 μ g (M1) e 10 μ g (M2) di proteina Tat ricombinante e dalla scimmia di controllo (M3) non inoculata. Colture di linfociti T arricchite in cellule CD8+ erano isolate dai PBMC tramite l'uso di biglie magnetiche adsorbite con un anticorpo anti-CD8 (Dynabeads, Dynal, Norway), secondo le istruzioni della ditta. La purezza delle colture era controllata mediante analisi al FACS utilizzando un pannello di anticorpi diretti contro marcatori cellulose-specifici (CD3, CD4 e CD8). Le colture arricchite in linfociti CD8+ erano

seminate (in duplicato) a 5×10^5 cellule/500 μ l per pozzetto in piastre da 48 pozzetti, precedentemente adsorbiti per 12 ore a 4° C con un anticorpo monoclonale anti-CD3 (2.5 μ g/ml, BioSource International, Camarillo, CA) e cresciute in terreno RPMI 1640, contenente il 10% di siero fetale bovino e IL-2 (20 U/ml). 250 μ l di terreno erano raccolti ogni 3 giorni, per due settimane, e sostituiti con un uguale volume di terreno fresco. I supernatanti erano centrifugati, filtrati con filtri di 0.45 μ m e conservati a -80° C. I supernatanti dei diversi prelievi, ad eccezione del primo prelievo, erano uniti e la presenza di attività antivirale era saggiata come la capacità dei supernatanti di inibire la replicazione virale in due sistemi, rispettivamente di infezione acuta e di infezione cronica. Per il sistema di infezione acuta è stata utilizzata la linea di cellule CEM x 174, che deriva dalla fusione della linea umana di cellule B 721.174 con la linea umana di cellule T CEM [Salter et al., Immunogenetics 21:235 (1985)]. Le cellule (2×10^5) erano incubate in tubi di polipropilene in presenza o assenza di 200 μ l dei supernatanti, raccolti come appena descritto, per 2 ore a 37° C, e quindi infettate con 500 TCID₅₀ del virus chimerico SHIV 89.6P per 2 ore a 37° C. Le cellule erano lavate 3 volte con terreno fresco, seminate alla concentrazione di 2×10^4 cellule per pozzetto, in piastre da 96 pozzetti, ed incubate, in un volume finale di 200 μ l, in assenza (cellule non trattate) o in presenza (cellule trattate) di diverse quantità (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) di terreno di coltura dei linfociti T CD8+ delle scimmie vaccinate o della scimmia di controllo. Ogni tre giorni dopo l'infezione aliquote dei terreni di coltura

erano prelevati e sostituiti con un uguale volume di terreno completo a cui era aggiunto il supernatante derivato dai linfociti CD8+ delle scimmie vaccinate. I risultati riportati in tabella sono relativi al giorno 7 dopo l'infezione e sono espressi come percentuale (%) di inibizione della replicazione virale nelle cellule trattate con i supernatanti dei linfociti CD8+ derivati dalle scimmie vaccinate rispetto alle cellule non trattate. Per analizzare la replicazione virale si determinavano i valori di RT, come descritto [Goletti et al., J. Virol. 69:2540 (1995)], o di p27 Gag con saggi ELISA nei terreni raccolti ai diversi tempi. Per il sistema di infezione cronica si utilizzava la linea OM-10-1 [Butera et al., J. Virol. 65:4645 (1991); Butera et al., J. Virol. 68:2726 (1994)], che è una linea umana di linfociti T cronicamente infettata con HIV-1. A tale scopo le cellule erano seminate (in doppio) alla concentrazione di 5×10^4 cellule/200 μ l per pozzetto, in piastre da 96 pozzetti, in presenza di anticorpi anti-TNF β (40 μ g/ml), in assenza o in presenza di diversi volumi (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) di supernatante derivato dai linfociti CD8+ delle scimmie vaccinate o di controllo. Le cellule erano attivate con l'aggiunta di PMA (10^{-7} M). Aliquote dei terreni di coltura erano raccolte il giorno successivo alla attivazione per determinare i livelli di espressione virale, che era analizzata ricercando la presenza di RT o p24 Gag con saggi ELISA. I risultati sono espressi come % di inibizione della riattivazione dell'infezione nelle cellule trattate rispetto alle cellule non trattate. I risultati degli esperimenti di infezione acuta e cronica riportati nella tabella sono relativi ai campioni trattati con 5 μ l di supernatante dei linfociti CD8+. ND: non determinato.

Per quello che riguarda la valutazione della ipersensibilità di tipo ritardato (DTH, risposta di tipo Th1) valutata mediante skin test, sia le scimmie vaccinate (M1 e M2) che quella di controllo (M3) sono risultate negative (Tabella 8).

TABELLA 8
Skin-test al Tat^a

Settimane dopo l'immunizzazione	Scimmie		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	-	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati e nella scimmia di controllo (controllo di specificità della risposta) alla 10^a, 15^a, 22^a, 27^a, 32^a e 37^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. Le scimmie M1 e M2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 mg o 10 mg, rispettivamente) risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia M3 è una scimmia di controllo non inoculata. La

comparsa di un nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, Ø ≥ 5 mm; + Ø ≥ 1-4 mm; +/-, eritema senza indurimento; -, Ø < 1 mm."

Postilla 54: Pagina 45 della descrizione: Riga 14: dopo la parola "mediata" inserire "con effetti antivirali."

H 00.03.97



Postilla 55: Pagina 45 della descrizione: Riga 15: **sostituire "2" con "M2".**

Postilla 56: Pagina 45 della descrizione: Riga 18: **radiare da "In un esperimento..." a "indotta da" e inserire "Sulla base di questi risultati è stato disegnato il secondo esperimento in cui abbiamo valutato l'effetto dell'immunizzazione indotta da 10 µg di "**

Postilla 57: Pagina 45 della descrizione: Riga 21: **sostituire "1-3" con M1-3".**

Postilla 58: Pagina 45 della descrizione: Riga 23: **sostituire "4-6" con "M4-6".**

Postilla 59: Pagina 45 della descrizione: Ultima Riga: **sostituire "7" con "M7".**

Postilla 60: Pagina 46 della descrizione: Riga 1: **sostituire "8" con "M8" e dopo la parola "autologo" aggiungere: "(controllo)".**

Postilla 61: Pagina 46 della descrizione: Riga 5: dopo "11" **radiare da "e 15 settimane...." fino a "esperimento pilota.", e inserire: "15, 21, 28 e 32 settimane. Alla 36ª settimana le scimmie M1-M6 ricevevano l'ultimo richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 mg) risospesa in 200 µl**

di Iscom (immune stimulating complex) e 300 µl di PBS. L'Iscom è un adiuvante composto dalla saponina Quil A, colesterolo e fosfolipidi in grado di incrementare la risposta umorale e cellulare [Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994); Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)]. Le scimmie M7 e M8 erano inoculate agli stessi tempi solo con gli adiuvanti. Negli stessi giorni dell'inoculazione

dell'immunogeno e alla 40^a, 44^a e 50^a settimana, venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami descritti nel primo esperimento pilota. Inoltre, venivano prelevati campioni di urine ed eseguiti tamponi vaginali per determinare la presenza di IgA secrete specifiche. Per valutare l'effetto protettivo della vaccinazione è stato effettuato il challenge delle scimmie, vaccinate e di controllo, alla 50^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, mediante inoculazione per via endovenosa di 10 MID₅₀ (50% monkey infectious dose) di "simian-human immunodeficiency virus" (SHIV), ceppo 89.6P e contenente il gene tat di HIV cresciuto e titolato in *Macaca fascicularis* [Reimann et al., J. Virol. 70: 3198 (1996); Reimann et al., J. Virol. 70: 6922 (1996); Karlsson et al., J. Virol. 71: 4218 (1997)]. Il monitoraggio post-challenge (ogni 2 settimane a partire dal giorno del challenge per il primo mese, ogni 4 settimane per i successivi 3 mesi, ed ogni 8 settimane fino a 6-12 mesi dal challenge) include anche l'analisi di parametri virologici quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. Per confermare l'avvenuta esposizione al virus è stata effettuata la ricerca degli anticorpi anti-SIV mediante kit commerciale per il rilevamento degli anticorpi anti-HIV-2

che riconosce anche anticorpi anti-SIV (Elavia Ac-Ab-Ak II kit, Diagnostic Pasteur, Paris, France).".

Postilla 62: Pagina 46 della descrizione: Riga 19: dopo la parola "disponibili" **radiare:** "e relativi alla 15a settimana dall'inizio della vaccinazione,".

Postilla 63: Pagina 47 della descrizione: Riga 2: dopo "da" **radiare** "1:12.800 a titoli maggiori di 1:50.000 (figure 4-6). Inoltre" e **inserire** "1:6.400 a 1:25.600 (figure 5-7). Tali anticorpi erano diretti principalmente contro la regione amino terminale (aa 1-20) di Tat, con titoli compresi tra 1:1600 a 1:3200 (figura 8) come evidenziato alla 22a settimana. Erano evidenziati anche anticorpi diretti contro la regione compresa tra gli aa 46-60 di Tat, con titoli compresi tra 1:100 e 1:200 (figura 8).

Postilla 64: Pagina 47 della descrizione: Riga 5: dopo le parole "trattate con" **radiare** da "la proteina Tat esogena" fino a Riga 7 di Pagina 55 della descrizione e **inserire** "diverse quantità della proteina Tat esogena, come precedentemente descritto per il primo esperimento pilota. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1-6 (immuni) diluiti 1:2, ottenuti alla 15^a settimana dal primo inoculo, erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da 30 ng/ml di Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel terreno di crescita delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) o i controlli negativi non avevano attività bloccante verso

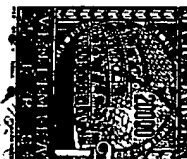
il Tat (Tabella 9). Inoltre, i sieri delle scimmie M1-6, diluiti 1:2, ottenuti alla 21^a settimana, erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml e 500 ng/ml di Tat esogeno. In particolare, erano ancora in grado di ridurre di circa 10 volte la replicazione virale indotta da dosi molto elevate di Tat (240 ng/ml e 500 ng/ml) (Tabella 9).

TABELLA 9

Attività neutralizzante dei sieri sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare^o

Campioni	Inibizione (%)
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M1	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M2	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M3	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M4	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M5	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M6	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 15)	89,8
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 15)	78,7
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 15)	70,8
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 15)	94,2
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M1	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M2	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M3	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M4	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M5	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M6	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	96,3
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	98,7
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	99
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	98,8
Tat (120 ng/ml)+ Pool sieri preimmuni M1-6	0
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	59,2
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	90,4
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	96,8
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	98,3
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	100
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	97,8
Tat (240 ng/ml)+ Pool sieri preimmuni M1-6	0
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	26,1
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	49,4

H O



Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	70,8
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	91,2
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	94,5
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	86
Tat (500 ng/ml)+ Pool sieri preimmuni M1-6	0
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	32,7
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	38,9
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	57,5
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	89,4
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	72
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	71,8

^aL'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1, come descritto nella Tabella 4. La proteina Tat ricombinante (30 ng/ml, 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml e 500 ng/ml) era aggiunta da sola o in presenza di un ugual volume di siero delle scimmie prelevati al tempo 0 (sieri preimmuni) o alla 15^a e 21^a settimana (sieri immuni). Le scimmie M1-3 erano inoculate con 10 mg di Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo erano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) o con Alum (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8). I risultati sono espressi come descritto nella Tabella 4.

L'attività neutralizzante il Tat, rilasciato durante l'infezione, da parte dei sieri delle scimmie veniva saggiata in cellule CEM x 174 infettate con il virus chimerico SHIV 89.6P. I risultati indicano che al 7° giorno dopo l'infezione il virus replicava nel 50% delle cellule di controllo infettate e coltivate in presenza dei sieri preimmuni delle scimmie M1-6, mentre non si osservava replicazione virale nelle cellule infettate e cresciute in presenza dei sieri immuni prelevati alla 44ª settimana (Tabella 10).

TABELLA 10

*Attività neutralizzante dei sieri sulla propagazione dell'infezione virale**

Campione	SHIV p27 (pg/ml)
SHIV + Siero preimmune M1	Neg
SHIV + Siero preimmune M2	Neg
SHIV + Siero preimmune M3	1,080
SHIV + Siero preimmune M4	0,602
SHIV + Siero preimmune M5	1,169
SHIV + Siero preimmune M6	Neg
SHIV + Siero immune M1	Neg
SHIV + Siero immune M2	Neg
SHIV + Siero immune M3	Neg
SHIV + Siero immune M4	Neg
SHIV + Siero immune M5	Neg
SHIV + Siero immune M6	Neg

*Cellule CEM x 174 (3×10^4 cellule/150 μ l) in piastre da 96 pozzetti

erano infettate con il virus chimerico SHIV 89.6P (5×10^5

TCID₅₀/cellula) per 2 ore a 37° C in RPMI 1640 contenente il 10% di

siero fetale bovino. Le cellule venivano lavate 2 volte con RPMI 1640 e risospese in 150 μ l di terreno completo a cui veniva aggiunto il 5% di siero prelevato al tempo 0 (preimmune) o alla 44ª settimana (immune) delle scimmie vaccinate con la proteina Tat (10 μ g) e RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). I plasmi erano stati precedentemente scomplementati a 56° C per 30' e analizzati mediante ELISA per controllare il titolo degli

anticorpi anti-Tat. Ogni siero era saggiato in doppio. Nei giorni 3, 5 e 7 successivi all'infezione venivano prelevati 120 μ l di terreno che era sostituito con un uguale volume di terreno fresco a cui veniva aggiunto ogni volta il 5% di siero preimmune o immune delle scimmie M1-6. La capacità dei sieri di neutralizzare il Tat extracellulare, rilasciato durante l'infezione, e la propagazione dell'infezione in vitro era valutata ricercando la presenza di virus nei terreni di coltura mediante saggi ELISA per l'antigene p27 Gag (Coulter International, Miami, FL). I risultati, rappresentati come valori di p27 (pg/ml), corrispondono alla media dei valori ottenuti da due pozzetti per ciascun campione al giorno 7 dopo l'infezione.

Era inoltre evidente una risposta proliferativa specifica al Tat a partire dall'11^a settimana (Tabella 11).

TABELLA 11

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dall'inizio della immunizzazione									
		0	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M1	PHA	16,96	10,50	15,27	33,8	7,2	51,5	64,3	36,05	24	65,7
	TT	11,69	1,96	3,01	1,2	1,2	1,3	0,93	1,4	10,05	7,2
	Tat	1,12	1,55	0,52	1,7	0,8	0,8	0,6	0,7	9,27	4,7
M2	PHA	31,27	25,75	21,28	87,1	25,7	56	38,2	40,3	29,03	26
	TT	1,12	1,8	0,57	1,7	1,15	1,6	4,95	1,2	1,51	2,9
	Tat	1,08	3,65	6,22	14,14	3,5	1,8	4,1	1,9	7,67	13,2
M3	PHA	22,42	7,89	16,88	36,3	148,5	42	78,9	27	53,71	ND
	TT	11,43	0,95	1,71	1,25	1,2	1,1	1	1	1,81	ND
	Tat	1,65	2,69	18,82	23,51	12,03	0,9	1,3	0,5	2,85	ND

M4	PHA	3,88	20,77	15,22	83,7	18,6	35	38,2	45,2	57,47	15,8
	TT	2,85	4,49	9,07	6,9	15,8	3,7	3,8	5	19,77	6,6
	Tat	1,29	3,01	3,24	7,9	10,1	2,6	1,5	3,9	33,61	4,7
M5	PHA	6,25	5,74	16,74	72,2	7,45	41	56,5	32,9	33,85	12
	TT	2,31	1,07	4,84	3,9	0,9	0,83	1,4	1,24	10,22	1,95
	Tat	1,80	0,66	1,76	3,6	2,22	0,8	1,14	1,3	1,33	1,4
M6	PHA	11,96	17,94	2,77	29,4	7,3	25	8,3	6,85	18,01	5,2
	TT	4,14	1,71	0,13	1,7	10,34	1,3	1,8	1,1	2,49	0,9
	Tat	1,37	1,06	0,11	2,95	9,3	1,13	1,3	1	5,8	0,3
M7	PHA	21,65	20,30	37,93	17,6	17,9	75	12,9	34,8	41,81	27,5
	TT	0,97	0,80	0,88	1	0,6	1,04	0,6	0,4	1,11	1,1
	Tat	1,78	0,68	0,73	1	0,42	0,9	0,5	0,8	1,07	0,4
M8	PHA	26,51	67,09	16,38	14,9	17,2	28,2	18,95	20,6	28,61	13,6
	TT	1,20	10,78	0,20	1,6	0,62	0,8	1,2	0,9	1,11	2,1
	Tat	1,12	0,00	0,21	1,03	0,57	0,6	0,5	0,9	1,04	1

^aLinfociti di sangue periferico venivano isolati, stimolati con PHA (4 mg/ml), il tossoide tetanico (TT) (10mg/ml) e Tat (1 o 5 mg/ml) e saggiati come descritto in Tabella 5. Le scimmie M1-3 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) e con Alum (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8). ND, non determinato.

Una forte risposta di linfociti T citotossici (CTL) era evidente in una scimmia immunizzata con la proteina Tat e RIBI (M1) e in due scimmie vaccinate con la proteina Tat e Alum (M4 e M5), mentre una risposta

H 02.03.99

MARCHIO BOLLO

CTL più debole era evidente nella scimmia M6 inoculata con Tat e Alum (figura 9 e Tabella 12).

TABELLA 12

Analisi della presenza di CTL^a

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Media	
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media		
M1	28	5,9	4,7	4,1	7,9	5,3	5,5	+	
	36	ND	14,4	8,8	4,9	6,7	8,7	+	
M2	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
M3	28	0	0	0	0	0	0	-	
	36	ND	0	0,6	0,5	2,0	0,7	-	
M4	28	0	0	1,1	1,1	2,6	0,9	-	
	36	ND	2,7	8,3	15	1,9	6,9	+	
M5	28	4,9	3,9	4,7	5,5	1,7	4,1	+	
	36	0	1	0	0	0	0,2	-	
M6	28	0	2,6	1,1	7,2	7,2	3,6	+/-	
	36	ND	0	0	0	0	0	-	
M7	36	0	0	0	0	0	0	-	
M8	36	0	0	0	0	0	0	-	

^aIl saggio era eseguito come descritto nella Tabella 6. Le scimmie M1-3

erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) e con Alum (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8). ND, non determinato.

Era osservata la presenza di attività antivirale totale (TAA) alla 44a settimana, valutata come la capacità dei PBMC delle scimmie vaccinate con la proteina Tat, coltivati in presenza di siero autologo, di resistere all'infezione con il virus chimerico SHIV 89.6P (Tabella 13).

TABELLA 13

Analisi della presenza di attività antivirale totale (TAA)^a

N° Scimmia	Giorni dopo l'infezione	
	7	17
	Dose infettante minima (TCID ₅₀ /cellula)	Dose infettante minima (TCID ₅₀ /cellula)
M1	10 ⁻²	10 ⁻²
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻³	10 ⁻³
M4	10 ⁻²	10 ⁻²
M5	10 ⁻²	10 ⁻²
M6	10 ⁻³	10 ⁻³
M7	10 ⁻³	10 ⁻³
M8	10 ⁻⁴	10 ⁻³

^aI PBMC erano prelevati alla settimana 44 dalle scimmie vaccinate con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6) e dalle scimmie di controllo inoculate con RIBI (M7) o Alum (M8). I PBMC, purificati mediante gradiente di Ficoll e seminati in triplicato alla concentrazione di $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ per pozzetto in piastre da 48 pozzetti, erano cresciuti in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e il 5% di siero autologo scomplementati, in presenza di un anticorpo monoclonale anti-CD3 (5 ng/ml) ed IL-2 (2U/ml), per 48-72 ore a 37° C. Le cellule erano quindi infettate con diverse dosi del virus chimerico SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ TCID₅₀/cellula) per 2 ore a 37° C, lavate 3 volte con PBS-A e risospese in 50% di terreno condizionato e 50% di terreno fresco alla concentrazione di $5 \times 10^5/\text{ml/pozzetto}$. Nei giorni 3, 7, 10, 14 e 17 dopo l'infezione, aliquote dei terreni di coltura erano prelevate per la valutazione della replicazione virale e sostituite con uguali volumi di terreno fresco. La replicazione virale era valutata ricercando nel terreno

di coltura l'antigene p27 Gag di SIV tramite saggio ELISA (Coulter International, Miami, FL). I risultati sono relativi ai giorni 7 e 17 dopo l'infezione e sono riportati come la dose minima di SHIV (TCID₅₀/cellula) con cui le cellule sono state infettate.

I risultati dimostrano la presenza di attività antivirale solubile mediata dai linfociti T CD8⁺ (CAF) (Tabella 14). In genere si osserva un incremento maggiore dell'attività CAF nelle scimmie vaccinate rispetto ai controlli.

TABELLA 14

*Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8⁺ (CAF) **

N° scimmia	Settimane dopo l'inizio della vaccinazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M1	0	8	30
	32	53	53
M2	0	36	0
	32	60	27
M3	0	0	37
	32	55	29
M4	0	45	0
	32	85	66
M5	0	41	0
	32	ND	ND
M6	0	49	18
	32	34	41,4
M7	0	39	39
	32	71	44
M8	0	37	0
	32	76	26,8

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule

T CD8⁺ (CAF) delle scimmie immunizzate con la proteina Tat (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6), e delle scimmie di controllo inoculate con RIBI (M7) o Alum (M8). L'infezione acuta era saggiata nelle cellule CEM x 174 infettate con lo SHIV 89.6P.

L'esecuzione del saggio era condotta come descritto nella Tabella 7 e i risultati sono relativi al giorno 7 dopo l'infezione. La presenza di attività CAF sull'infezione cronica era saggiata nella linea cellulare U1 [Folks et al. Science 238:800 (1987)], che è una linea umana promonocitica cronicamente infettata con HIV-1. Le cellule U1, seminate alla concentrazione di 1×10^4 cellule/200 μ l per pozzetto in piastre da 96 pozzetti, erano incubate con PMA (10^{-8} M) per indurre la riattivazione dell'infezione di HIV-1, in assenza o in presenza di diversi volumi (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) del terreno di coltura dei linfociti T CD8+ delle scimmie vaccinate o delle scimmie di controllo. Tre giorni dopo l'induzione, la presenza di HIV-1 era ricercata nel terreno di coltura mediante la determinazione dei valori di RT virale o p24 Gag. I risultati sono riportati come % di inibizione della replicazione virale nelle cellule trattate con i supernatanti dei linfociti CD8+ rispetto alle cellule non trattate. I risultati degli esperimenti di infezione acuta e cronica riportati nella tabella sono relativi ai campioni trattati con 5 μ l di supernatante dei linfociti CD8+.

Era analizzata la produzione di citochine (γ IFN, IL-4, TNF α) e della chemochina Rantes da parte dei PBMC delle scimmie vaccinate con la

proteina Tat e l'adiuvante RIBI (M1-3) o Tat e l'adiuvante Alum (M4-6) e delle scimmie di controllo M7 ed M8 (Tabella 15).

TABELLA 15

Analisi della produzione di citochine e chemochine^a

N° scimmia	Controllo				PHA				TT			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	988/1096	-/-	948/-	1788/2564	-/-	-/3.8	-/-	nd/nd
M2	-/-	-/-	125/-	-/-	325/280	-/-	244/172	292/284	88/66	-/-	-/-	nd/nd
M3	Nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	Nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	Nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M4	-/-	-/-	-/-	-/-	426/66	-/-	98/-	-/284	-/-	-/-	-/224	nd/nd
M5	-/-	-/-	48/-	-/-	279/303	-/-	416/-	536/608	-/-	-/-	-/-	nd/nd
M6	-/-	-/-	-/-	246/-	255/137	-/-	-/-	1124/268	-/-	-/-	-/266	nd/nd
M7	-/-	-/-	-/-	-/-	150/169	-/-	40/-	1228/976	-/-	-/4	-/nd	nd/nd
M8	-/-	-/-	-/-	-/-	0/0	20/32	60/-	2160/1588	-/-	-/-	-/nd	nd/nd

N° scimmia	Tat (1 µg)				Tat (5 µg)			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/-	-/-
M2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M3	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	Nd/nd	Nd/nd	nd/nd	nd/nd
M4	-/-	-/-	378/430	-/-	-/-	-/-	344/352	-/-
M5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M6	-/-	-/5	-/-	-/-	-/78	-/-	150/-	-/-
M7	-/40	-/3.3	84/-	-/-	-/3.2	-/-	-/-	-/-
M8	-/-	-/4.8	-/-	-/-	-/10	-/-	-/-	-/-



**Analisi della produzione di citochine e chemochine a 48 e 96 ore di coltura (48/96) da parte di PBMC delle scimmie vaccinate con 10 mg di proteina Tat ricombinante con l'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Le scimmie di controllo (M7 ed 8) erano state inoculate solo con l'adiuvante RIBI o Alum, rispettivamente. I PBMC, prelevati alla settimana 44 dall'inizio dell'immunizzazione e purificati mediante gradiente di Ficoll, erano seminati alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e cresciuti, in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino, non stimolati (controllo), per valutare il rilascio spontaneo di citochine o chemochine, oppure stimolati con PHA (2 $\mu\text{g/ml}$), il tossoide del tetano (TT, 5 $\mu\text{g/ml}$) o Tat (1 o 5 $\mu\text{g/ml}$). Aliquote dei terreni di coltura erano raccolte 48 e 96 ore dopo la stimolazione per la determinazione della presenza di citochine e chemochine, che veniva eseguita utilizzando kits ELISA commerciali della ditta BioSource International (Camarillo, CA, USA) per la determinazione delle citochine, e della Ditta R&D Systems (Abingdon, Oxon, UK) per la quantificazione di Rantes. I risultati sono riportati come valori (pg/ml) delle citochine o di Rantes a 48 e 96 ore (48/96), rispettivamente. I valori di cut off erano (pg/ml): γIFN , 31.2; IL-4, 3.12;*

TNF α , 15.6; Rantes, 62.5. (-), i valori erano inferiori ai rispettivi valori di cut off. nd, non determinato.

Inoltre, alla 15^a settimana 5 scimmie inoculate con la proteina ricombinante (scimmie M2-6) reagivano allo skin test con Tat, con una forte reazione di ipersensibilità ritardata (Tabella 16 e figura 10). Nelle

scimmie 4 e 5 la reazione allo "skin-test" diventava ancora più evidente nelle settimane successive (Tabella 16).

TABELLA 16
Skin-test al Tat ^a

N° scimmia	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione						
	11	15	21	28	32	36	44
M1	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
M3	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-
M4	-	+	++	++	++	++	++
M5	+/-	+	++	+	++	++	+
M6	-	+	+/-	+/-	-	-	-
M7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a, 15^a, 21^a, 28^a, 32^a, 36^a e 44^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. Le scimmie M1-3 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) e con Alum (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8).

La comparsa di un nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.

I risultati post-challenge indicano che 4 su 6 (67%) degli animali vaccinati erano protetti dall'infezione con 10 MID₅₀ di SHIV89.6P,

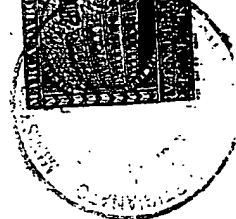
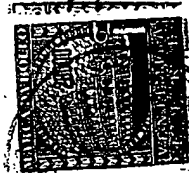
11 02 03 99

come indicato dai risultati dei tests virologici (Tabella 17). In particolare, nel plasma delle scimmie M1, M2, M4 e M6 non era rilevabile la presenza dell'antigene virale p27 Gag, nelle cellule di tali scimmie non era evidenziabile, mediante metodica di PCR, DNA provirale e la citoviremia era anche negativa. Le altre due scimmie vaccinate (M3 e M5) risultavano invece infette, come evidenziabile dalla presenza di p27 nel plasma e di DNA provirale nelle cellule e dal dato di citoviremia (Tabella 17). Entrambi i controlli (M7 ed M8) risultavano infetti sulla base degli stessi parametri virologici. A riprova della infettività della carica virale utilizzata per il challenge un'ulteriore scimmia naive (M13) è stata inclusa fra i controlli ed inoculata con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P (3.5 volte inferiore alla dose usata per il challenge delle scimmie in protocollo) ed è risultata infetta. Per confermare l'avvenuta esposizione al virus è stata inclusa la determinazione, già descritta in questo Esempio, degli anticorpi contro antigeni di SIV presenti nel virus chimerico SHIV89.6P (Gag, Pol, RT, Nef). La presenza di questi anticorpi nelle scimmie risultate negative agli esami virologici conferma l'avvenuta esposizione al virus, o l'infezione abortiva del virus usato per l'inoculo. Per le scimmie con bassi titoli

anticorpali anti-SIV sarà valutata la produzione in vitro di IgG specifiche per il virus (IVAP) [Zamarchi et al., AIDS Res. Human Retrov. 9:1139 (1993); Fiore et al., AIDS 5:1034 (1991)] con la seguente metodica. Due milioni di PBMC vengono seminati in un pozzetto di una piastra da coltura da 24 pozzetti e stimolati con 2 mg/ml di fitolacca americana (PWM, Sigma, St. Louis, USA). Dopo 7

giorni di incubazione (a 37° C, con il 5% di CO₂, ed il 95% di umidità) sarà raccolto il supernatante per la determinazione degli anticorpi anti-SIV con la stessa metodica già riportata in questo Esempio. Ove necessario verranno effettuati tests di proliferazione linfocitaria in risposta ad antigeni di SIV analogamente a quanto fatto per il Tat di HIV-1, come riportato in questo Esempio.

H O D O



H 02.03.99

TABELLA 17

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con il virus SHIV 89.P							
	15				30			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg) ^b	Citoviremia ^c	IgG anti-SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg)	citoviremi a	IgG anti-SIV
M1	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M3	73,3	855	707,3	Neg	26.22	959	74.95	Neg
M4	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M5	964	1147	>2818,3	Neg	20.8	>10 ⁶	78	1:2
M6	<20	<1	Neg	1:8	<20	<1	Neg	1:8
M7	287,8	838	707,9	>1:50	65.2	858	354,8	>1:50
M8	106,7	376	707,9	1:2	<20	311	44,6	1:5
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600

Analisi dei parametri virologici dopo challenge delle scimmie vaccinate con 10 mg di proteina Tat ricombinante con l'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Le scimmie di controllo (M7 ed 8) erano state inoculate solo con l'adiuvante RIBI o Alum, rispettivamente. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P.

^aL'antigenemia plasmatica era determinata ricercando l'antigene p27 Gag di SHIV tramite ELISA (Innogenetics, Belgio) ed è espressa come valori di p27 (pg/ml). Neg, il valore era inferiore al valore di cut off (18 pg/ml).

^bIl DNA era estratto dal sangue intero utilizzando il kit QIAamp blood (Angiogen GmbH and Qiagen Inc., Hilden, Germany). La qualità del DNA era controllata amplificando con PCR il gene della β -globina come descritto [Saiki et al., Science 230:1350 (1985)]. La presenza del DNA provirale era ricercata mediante PCR semiquantitativa su 1 µg di DNA utilizzando i primers SG1096Ngag (nucleotidi 1096-1119 del genoma di SIVmac251: 5'TTAGGCTACGACCCGGCGGAAAGA3') e SG1592CgagD (nucleotidi 1569-1592 del genoma di

Vmac251: 5'ATAGGGGGTGCAGCCTTCTGACAG3') che amplificano un frammento di 496 coppie di basi del gene *gag* di SHIV, come descritto [Titti et al., Cell. Pharmacol. AIDS 3:123 (1996)]. Per quantificare il numero di copie di DNA provirali, in ogni esperimento era inclusa una curva standard di riferimento utilizzando come DNA stampo il plasmide pCMRII- Δ gag (contenente una delezione di 100 coppie di basi del gene *gag* di SIVmac251) e i primers descritti sopra, che amplificano un frammento di 396 coppie di basi. I DNA amplificati erano analizzati mediante elettroforesi e quantificati mediante densitometria (Ultrascan LX Enhancer Laser, LKB, Bromma, Svezia). La relazione tra i valori di densità ottica e il numero di molecole del plasmide Δ gag era stabilito mediante analisi della regressione lineare (Statgraphics, Manugistics, Inc. Cambridge, MA). I valori di densità ottica erano lineari fino a 1000 molecole (coefficiente di correlazione = 0.954 ± 0.026). Il n° di copie di DNA provirale di SHIV/ μ g di DNA era determinato interpolando i valori di densità ottica dei campioni sulla curva di riferimento. Il limite di sensibilità del saggio era 1 copia di provirus / μ g di DNA.

~~la citoviremia era determinata in saggi di cocoltura nei quali 1×10^4~~

cellule della linea CEMx174 venivano coltivate in presenza di diluizioni scalari (da 1×10^6 a $3,9 \times 10^3$ cellule per pozzetto, per un totale di 12 diluizioni) dei PBMC in esame in micropiastre da 96 pozzetti. Al giorno 3, 7 e 10 post-infezione, 150 mL di terreno completo erano aggiunti in ciascun pozzetto dopo aver raccolto un ugual

volume di supernatante che veniva saggiato per la presenza della p27 Gag virale mediante test ELISA (Innogenetics, Belgio). I risultati ottenuti venivano analizzati con la formula di Reed e Muench per determinare il numero di PBMC infetti produttivamente per milioni di cellule totali.

^dLa presenza di anticorpi contro il virus SHIV era determinata sui plasmi delle scimmie saggiati in doppio a diverse diluizioni (1:2, 1:10, 1:50) utilizzando il kit Elavia Ac-Ab-Ak II kit (Diagnostic Pasteur, Paris, France), secondo le istruzioni della ditta. E' riportata l'ultima diluizione alla quale i valori dei campioni erano superiori al valore di cut off.

^ePer la scimmia M13 è stato effettuato l'isolamento virale invece della citoviremia. L'isolamento del virus era effettuato come segue. I PBMC (3×10^6) delle scimmie infettate con diverse dosi di SHIV 89.6P, purificati in gradiente di Ficoll, erano coltivati con cellule CEM x 174 (1×10^6) in 1 ml di terreno contenente il 10% di siero fetale bovino. Dopo 24 ore le cellule erano diluite alla concentrazione di 1×10^6 /ml e coltivate per 3 giorni. Quindi, si raccoglievano 2 ml di terreno e si riseminavano le cellule alla concentrazione di 3×10^5 /ml in 7 ml. Le cellule in eccesso erano scartate. Questa procedura era ripetuta due

volte alla settimana per 4 settimane. La presenza del virus era ricercata nel terreno di coltura, raccolto ai diversi tempi, determinando la presenza dell'antigene p27 Gag con saggio ELISA (Innogenetics, Belgio) e successivamente la presenza della trascrittasi inversa (RT). L'isolamento virale era considerato positivo (+) quando entrambi i saggi

H 00 03 99



(p27 ed RT) erano positivi in 3 campioni sequenziali. In caso contrario, l'isolamento era considerato negativo (-).

'E' stata effettuata una DNA-PCR qualitativa.

I dati virologici trovavano piena rispondenza con la determinazione del numero assoluto dei linfociti CD4 che risultavano drasticamente diminuiti nelle scimmie risultate infette (M3, M5, M7, M8) come indicato in tabella 18.

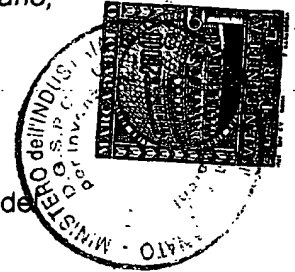


TABELLA 18

Analisi al FACS dei linfociti CD4+ e CD8+

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con SHIV 89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
M1	32,1 (1490)	53 (2460)	0,6	ND	ND	ND	30,8 (2420)	57,3 (4500)	0,54	30,6 (2460)	57,9 (4670)	0,53
M2	27,7 (1550)	45,3 (2530)	0,6	ND	ND	ND	35,5 (2120)	43,7 (2610)	0,81	29,6 (2000)	42,4 (2870)	0,7
M3	33 (1120)	39,3 (1340)	0,84	ND	ND	ND	3,1 (190)	75,6 (4660)	0,04	6,2 (240)	70 (2750)	0,09
M4	16,6 (670)	68,3 (2740)	0,24	ND	ND	ND	17,25 (2050)	68,7 (8180)	0,25	15,5 (1520)	75 (7350)	0,21
M5	36,3 (2770)	43,9 (3350)	0,83	ND	ND	ND	1,1 (90)	82,3 (1300)	0,01	4,1 (480)	75,5 (8730)	0,05
M6	35,3 (1210)	43,4 (1490)	0,81	ND	ND	ND	35,9 (1240)	45,5 (1570)	0,79	37,8 (3700)	43,7 (4280)	0,86
M7	36,1 (1610)	31,3 (1400)	1,15	ND	ND	ND	7,4 (480)	66,1 (4260)	0,11	13,7 (860)	56,7 (3550)	0,24
M8	25,7 (850)	51,3 (1710)	0,5	ND	ND	ND	3,3 (210)	76,2 (4840)	0,04	8,1 (590)	64,9 (4670)	0,13
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

Analisi al FACS dei linfociti CD4+ e CD8+ delle scimmie vaccinate con

10 mg di proteina Tat ricombinante con l'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum

(M4-6). Le scimmie di controllo (M7 ed 8) erano state inoculate

solo con l'adiuvante RIBI o Alum, rispettivamente. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P. L'analisi era eseguita al fluorescence-activated-cell-sorter (FACS) come descritto [Rosenberg et al., *Int. Immunol.* 9 (5):703 (1997)], utilizzando anticorpi monoclonali direttamente marcati (anti-CD4-FITC, BioSource; anti-CD8-PerCp, Becton-Dickinson). ND, non determinato. I risultati pre-challenge indicano che l'immunogeno Tat, nonché entrambi gli adiuvanti RIBI e Alum (o Iscom che è stato utilizzato come adiuvante nell'ultimo richiamo), erano ben tollerati dagli animali e non erano tossici, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione con Tat ottenuti nel primo esperimento pilota. Inoltre, questi dati confermano l'osservazione preliminare riportata nel primo esperimento e forniscono ulteriori evidenze che la proteina ricombinante Tat induce una forte risposta umorale e cellulare specifica anti-Tat con effetti antivirali in vitro e in vivo. I risultati post-challenge (4/6 scimmie protette) confermano le aspettative dei risultati in vitro ed indicano che il vaccino anti-Tat proteico è in grado di indurre protezione dall'infezione e quindi dalla malattia. Il follow-up delle scimmie chiarirà analoghi effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia nel caso delle due scimmie infettate.

Esempio 5.

**Inoculazione in *Macaca fascicularis* di un vaccino anti-Tat a DNA:
valutazione della sicurezza, tollerabilità, risposta immune specifica
e dell'efficacia protettiva al challenge virale.**

Postilla 65: Pagina 55 della descrizione: Riga 17: **sostituire "PBS"** con "PBS-A" e **radiare** "(senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺)".

Postilla 66: Pagina 55 della descrizione: Riga 18: dopo "sono" **inserire** "successivamente".

Postilla 67: Pagina 56 della descrizione: **radiare** da Riga 3 di pagina 56 a Riga 21 compresa di Pagina 58 della descrizione e **inserire:** "La tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare) e l'efficacia protettiva al challenge virale del DNA del plasmide pCVTat erano valutate nelle scimmie cynomolgus (*Macaca fascicularis*). In un primo esperimento abbiamo utilizzato 3 scimmie secondo il seguente schema: la scimmia M1 era inoculata con 200 µg di DNA del plasmide pCVTat risospesi in 300 µl di PBS per via intradermica in 2 siti nel dorso vicino ai linfonodi ascellari (150 µl/sito); la scimmia M2 era inoculata con 500 µg di DNA del plasmide pCVTat risospesi in 500 µl di PBS per via intramuscolare in 2 siti nel dorso (250 µl/sito). Ai giorni 1 o 5 precedenti l'inoculazione intramuscolare, venivano inoculati 250 µl di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene, nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente veniva eseguita

H 02.03.99

l'inoculazione del plasmide, per aumentare l'uptake e l'espressione del DNA nel muscolo [Danko et al., Vaccine 12:1499 (1994); Fine et al., Ann. Plast. Surg. 20:6 (1988)]. La scimmia M3 era il controllo non inoculato. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue nei giorni -42 e -35 antecedenti la prima vaccinazione per la determinazione dei parametri di base. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22, 27, 32 e 37 settimane. Infine alla 42^a settimana veniva eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 mg) risospesa in 200 µl di Iscom e 300 µl di PBS. Gli animali erano osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'Esempio 4. Inoltre si prelevavano campioni di 10 ml di sangue negli stessi giorni dell'inoculazione come descritto nell'esempio 4. L'effetto protettivo della vaccinazione era determinato dopo il challenge delle scimmie, che e' stato effettuato alla 65^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ di SHIV 89.6P. Il monitoraggio post-challenge, ancora in corso, è stato effettuato come descritto nell'Esempio 4.

I risultati di questo esperimento sono i seguenti. Nelle due scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri clinici, ematochimici e comportamentali. Non si riscontravano segni di infiammazione o neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che il DNA del plasmide



pCVTat era ben tollerato dagli animali e non era tossico alle dosi somministrate, utilizzando le vie di inoculazione scelte. Nella scimmia M1, vaccinata con 200 µg di DNA per via intradermica, erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 32^a settimana (Figura 11). I titoli anticorpali dalla 32^a alla 58^a settimana erano compresi tra 1:100 e 1:800 (Figura 12). La mappatura degli epitopi riconosciuti da questi anticorpi (effettuata come descritto nella legenda della Figura 4) evidenziava, alla 37^a settimana, reattività contro i peptidi di Tat corrispondenti agli aa 1-20, aa 46-60 e aa 65-80 con titoli rispettivamente di 1:200, 1:100 ed 1:50 (dati non mostrati). Nella scimmia M2, inoculata con 500 µg di DNA per via intramuscolare, gli anticorpi anti-Tat erano scarsamente evidenziabili (titolo 1:50, dato non mostrato) per tutto il periodo di studio. I risultati sono riportati nella figura 11. L'attività neutralizzante il Tat nel siero della scimmia M1, immunizzata con 200 µg di DNA per via intradermica, veniva saggiata mediante saggio di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come descritto nell'Esempio 4. Questo saggio ha dimostrato che il siero della scimmia

M1, diluito 1:2 e ottenuto alla 37^a settimana dal primo inoculo, riduceva la replicazione virale indotta da 30 ng/ml di Tat esogeno, mentre il siero della stessa scimmia prelevato al tempo 0 (preimmune) non bloccava il Tat (Tabella 19).

TABELLA 19

*Attività neutralizzante dei sieri sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare**

Campioni	Inibizione (%)
Tat + Siero preimmune M1	0
Tat + Siero immune M1	51

*L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1 trattate con 30 ng/ml di proteina Tat ricombinante, pre-incubata con un uguale volume di siero prelevato al tempo 0 (siero preimmune) o alla 37^a settimana (siero immune) della scimmia M1, inoculata con 200 µg del plasmide pCVTat per via intradermica. Il saggio era eseguito ed i risultati espressi come descritto nella Tabella 4.

I risultati in Tabella 20 dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat, alla 42^a settimana, nella scimmia M1 immunizzata con 200 µg di DNA per via intradermica, mentre nella scimmia M2 non era evidenziata tale tipo di risposta.

TABELLA 20

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione							
		15	22	27	32	37	42	48	58
M1	PHA	32,9	45	89,3	40,5	3,1	13,3	ND	13,1
	TT	0,8	2,7	1,5	1,3	0,6	9	1,2	1,6
	Tat	0,9	1,7	1,2	1,1	1,1	5,9	1	1
M2	PHA	11,7	18,5	21,8	32,2	1,1	6,2	7	18,9
	TT	0,9	1,8	0,8	1,1	1	1,5	1,1	1
	Tat	0,8	1,4	0,9	1,1	1,1	1,3	1,1	1
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1	77,8	ND	2,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6	36,8	1	2,1
	Tat	2,1	1,4	2,2	0,7	1,5	2,8	0,8	0,9

^aLinfociti di sangue periferico venivano isolati, stimolati con PHA (4 mg/ml), tossoide tetanico (TT) e Tat (1 o 5 mg/ml) e saggianti come descritto nella Tabella 5. Le scimmie erano inoculate con 200 mg (M1) di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica o con 500 mg (M2) di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia di controllo (M3) non era inoculata. ND, non determinato.

L'attività citotossica (CTL) anti-Tat era rilevata nella scimmia M1 alla 48^a settimana e nella scimmia M2 alla 42^a settimana (Tabella 21).

TABELLA 21

Analisi della presenza di attività citotossica specifica per Tat (CTL)^a

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Attività CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	42	27,4	27,8	17,1	9,8	3,9	17,2	+
	48	ND	ND	21,3	0	11,7	11	+
M2	42	1,2	5,9	2,4	1	0	2,1	-
	48	ND	ND	ND	57	25,1	41	+

H 00:03:00



M3	42	1,8	0	0	1,2	0	0,6	-
	48	ND	ND	0	0	0	0	-

**Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 6. Le scimmie erano inoculate con 200 mg (M1) di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica o con 500 mg (M2) di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia di controllo (M3) non era inoculata. ND, non determinato.*

I risultati in Tabella 22 inoltre dimostrano la presenza di attività antivirale totale (TAA) in entrambe le scimmie vaccinate con 200 e 500 µg di DNA alla 52^a settimana.

TABELLA 22

Analisi della presenza di attività antivirale totale (TAA)^a

N° scimmia	Giorni dopo l'infezione	
	7	17
	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)
M1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

**Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 13. Le scimmie erano inoculate con 200 mg (M1) di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica o con 500 mg (M2) di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia di controllo (M3) non era inoculata. I PBMC erano prelevati alla settimana 52 dall'inizio della vaccinazione ed erano infettati con 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ TCID₅₀ di SHIV 89.6P. I risultati sono*

espressi come la dose minima di SHIV(TCID₅₀/cellula) a cui le cellule sono state infettate.

I risultati in Tabella 23 dimostrano la presenza di attività antivirale solubile CAF mediata dai linfociti T CD8+, alla 22^a e 27^a settimana in entrambe le scimmie vaccinate che è superiore rispetto alla scimmia di controllo.

TABELLA 23

*Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8⁺ (CAF)**

N° scimmia	Settimane dall'inizio della vaccinazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M1	22	62	27
	27	56	25
M2	22	74	ND
	27	28	ND
M3	22	24	ND
	27	37	22

**Analisi della presenza di attività antivirale solubile prodotta dalle cellule*

T CD8⁺ (CAF) delle scimmie inoculate con 200 µg (M1) e 500 µg (M2)

di DNA del plasmide pCVTat e della scimmia di controllo (M3) non

inoculata. L'attività antivirale sull'infezione acuta e cronica era eseguita

in cellule CEM x 174 infettate con il virus SHIV 89.6P e sulle cellule

OM-10-1 cronicamente infettate con HIV-1, come descritto nella

Tabella 7. I risultati sono espressi come percentuale (%) di inibizione

della replicazione virale nelle cellule trattate con i supernatanti dei

linfociti T CD8+ rispetto alle cellule non trattate. I risultati degli esperimenti di infezione acuta e cronica riportati nella tabella sono relativi ai campioni trattati con 5 μ l di supernatante dei linfociti CD8+. ND, non determinato.

I risultati in Tabella 24 dimostrano che la scimmia M1, inoculata con 200 mg di DNA per via intradermica, era positiva allo skin test alla 22^a settimana.

TABELLA 24
Skin test al Tat^a

Settimane dopo l'immunizzazione	Scimmie		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	+	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-
42	-	-	-
48	-	-	-
52	-	-	-
58	-	-	-

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati e nella scimmia di controllo (controllo di specificità della risposta) alla 10^a, 15^a, 22^a, 27^a, 32^a, 37^a, 42^a, 48^a, 52^a e 58^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. La scimmia M1 era inoculata con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica, la scimmia M2 con 500 mg di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La

scimmia M3 (controllo) non era inoculata. La comparsa di un nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.

Questi risultati indicano che il plasmide pCVTat era ben tollerato alle dosi inoculate sia per via intradermica che intramuscolare e non era tossico. Inoltre, questi risultati dimostrano che l'immunizzazione con il DNA pCVTat induce la comparsa di una risposta umorale (seppure più bassa rispetto a quella indotta dalla immunizzazione con la proteina Tat ricombinante), e cellulare specifica anti-Tat con effetti antivirali.

Per quanto riguarda l'efficacia protettiva in seguito a challenge, effettuato alla 65^a settimana dall'inizio della vaccinazione, i dati virologici (Tabella 25) di antigenemia, citoviremia e di copie di DNA provirale (DNA-PCR) indicano che la scimmia M2, immunizzata con Tat-DNA per via intramuscolo, risultava protetta dall'infezione con 10 MID₅₀ di SHIV89.6P, mentre la scimmia M1, immunizzata per via intradermica e con una quantità minore di DNA (200 mg), era infettata

suggerendo che, per quanto concerne l'immunizzazione con DNA, la vaccinazione per via intramuscolo è più efficace di quella intradermica. La scimmia di controllo M3 risultava resistente all'infezione. Tuttavia, come descritto in precedenza, questa scimmia, diversamente dai

H 02.03.99

controlli degli altri protocolli, era stata ripetutamente sottoposta a skin test per il Tat al fine di controllare la specificità del test (Tabella 24) ed era risultata, sebbene a basso titolo (1:100), ripetutamente positiva per anticorpi anti-Tat a partire dalla 32^a settimana dall'inizio della vaccinazione (dati non mostrati). Infine, la risposta proliferativa al Tat evidenziava una debole e sporadica reattività all'antigene (Tabella 20). Benché non conclusivi, questi dati indicano che la ripetuta inoculazione per via intradermica di 5 o 6 mg di Tat possa aver indotto l'immunizzazione dell'animale e la protezione al challenge. Di conseguenza, la scimmia M3 verrà considerata vaccinata e studiata come tale.

TABELLA 25

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con il virus SHIV 89.P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copie/ μg) ^b	Cito- viremia ^c	IgG anti- SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ μg)	Cito- viremi a	IgG Anti-SIV ^d	p27 (pg/ ml)	DNA PCR (copie / μg)	Cito- viremi a	IgG anti- SIV ^d
M1	1796	1278	>2818,3	1:10	68,6	1048	353,9	1:50	<20	8	21,3	1:800
M2	<20	<1	Neg	1:10	<20	<1	Neg	1:50	<20	<1	Neg	1:10
M3	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	1:100

La scimmia M1 era stata immunizzata con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica, la scimmia M2 con 500 mg di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia M3 (controllo) non era stata vaccinata. I parametri virologici sono stati valutati come riportato nella legenda della Tabella 17.

La determinazione al FACS della percentuale e del numero assoluto dei linfociti CD4 e CD8 confermava il dato virologico, con una netta diminuzione (di circa 4 volte) dei linfociti CD4+ nella scimmia infetta già al primo controllo (giorno 30 dopo il challenge) e che si confermava alla determinazione successiva (giorno 60) (Tabella 26).

TABELLA 26

Analisi al FACS delle popolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con SHIV 89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+
M1	27,5 (940)	40,7 (1390)	0,68	ND	ND	ND	8,1 (250)	56,5 (1780)	0,14	9,5 (360)	69,7 (2650)	0,14
M2	22,2 (490)	36,8 (810)	0,6	ND	ND	ND	16,4 (580)	42,4 (1500)	0,39	10,9 (940)	52,7 (4560)	0,21
M3	28,7 (1170)	41,1 (1680)	0,7	ND	ND	ND	19,5 (970)	48,7 (2430)	0,4	17,9 (900)	52,2 (2620)	0,34

L'analisi era eseguita come riportato nella legenda della tabella 18. La scimmia M1 era stata immunizzata con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica, la scimmia M2 con 500 mg di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia M3 (controllo) non era stata vaccinata.

Sulle base di questi risultati è stato disegnato il secondo esperimento in cui è stato valutato l'effetto dell'immunizzazione con il DNA del plasmide pCVTat in tre scimmie (M9-11), rispetto ad una scimmia di controllo (M12) che riceveva il DNA del plasmide pCV0. Le scimmie sono state inoculate per via intramuscolare con 1 mg di pCVTat (M9-11) o di pCV0 (M12), in 2 siti nel dorso. Ai giorni 1-5, precedenti la vaccinazione, 250 µl di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene venivano inoculati nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente veniva eseguita l'inoculazione del plasmide. Le scimmie erano vaccinate al tempo 0 e dopo 6, 11, 15, 21, 28 e 32 settimane. Infine alla 36^a settimana veniva eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 mg) risospesa in 200 µl di Iscom e 300 µl di PBS. Gli animali erano

osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'Esempio 4. Inoltre si prelevavano campioni di 10 ml di sangue al giorno -9 prima dell'inizio della immunizzazione e negli stessi giorni della inoculazione come descritto nell'esempio 4. Al fine di

valutare l'effetto protettivo della vaccinazione, è stato effettuato il challenge delle scimmie alla 50^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ di SHIV 89.6P. Il monitoraggio post-challenge è attualmente in corso ed è, effettuato come descritto nell'Esempio 4.

I risultati di questo esperimento sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri clinici, ematochimici e comportamentali. Non si rilevavano segni di infiammazione o neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati confermano che il DNA del plasmide pCVTat era ben tollerato dagli animali e non era tossico alla dose di 1 mg somministrata per via intramuscolare. Anticorpi IgG specifici anti-Tat erano evidenziati dalla 15^a settimana (figura 13), con titoli compresi tra 1:50 e 1:100 (dati non mostrati). Era inoltre evidente una risposta proliferativa al Tat in una scimmia (M11) già dopo 2 settimane (Tabella 27).

TABELLA 27
*Risposta proliferativa al
Tat^a*

N°Sci mmia	Stimolo	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione										
		2	6	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M9	PHA	8,9	9,2	17,1	58,2	18	47,1	43,4	3,1	72,6	64,6	7
	TT	2,9	1,7	0,9	1	1,8	0,7	1,1	0,8	1	7	2,7
	Tat	0,4	0,5	0,6	1,5	1,6	0,9	1	0,7	1,1	7	1,9
M10	PHA	8,5	18	19,8	ND	10,1	2,2	14,7	15,2	4,4	8,4	ND
	TT	2,4	0,3	0,8	ND	1,1	0,6	1	0,9	0,6	6,4	ND
	Tat	1	0,3	0,7	ND	1,1	0,5	1	0,9	0,7	4,2	ND

H 000



M11	PHA	25,7	43,3	81,7	12,1	27,8	3,4	21,3	14,1	15,9	25,8	ND
	TT	4,2	1,9	1,3	0,9	1,1	3,6	1,2	0,8	0,3	1,8	ND
	Tat	5,1	0,9	1,6	0,7	1,1	1,1	1,2	0,7	0,7	3	ND
M12	PHA	28,7	30,9	41	50,7	30,8	7,6	43	22,6	34,6	19,9	55,1
	TT	3,2	1,6	0,9	5,2	1,6	1,6	1,3	1,1	1	0,7	3,1
	Tat	3,2	1,4	0,8	1,3	1	1,6	1	0,8	1	1,6	1,3

^aLinfociti di sangue periferico venivano isolati, stimolati con PHA (4 mg/ml), il tossoide tetanico (TT) (10 mg/ml) e Tat (1 o 5 mg/ml) e saggiati come descritto in Tabella 5. Le scimmie (M9-11) erano inoculate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. ND, non determinato.

La presenza di CTL anti-Tat è stata osservata nella scimmia M11 alla

32^a settimana post-immunizzazione (Tabella 28).

TABELLA 28

Analisi dell'attività citotossica specifica per Tat (CTL)^a

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Attività CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M9	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	4,2	0	0	0	0,9	1	-
M10	32	0	0	9,9	2,7	0	2,5	-
	50	3,5	0	2,3	0	0	1,1	-
M11	32	0	10,5	8,9	3,5	0,9	4,7	+
	50	0	0	0	3,8	0,3	0,8	-
M12	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	0	0	0	0	0	0	-

*Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 6. Le scimmie (M9-11) erano inoculate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0.

PBMC ottenuti alla 44^a settimana dalla stessa scimmia M11 risultavano resistenti all'infezione, in vitro, con diluizioni seriali del virus chimerico SHIV 89.6P in un test (TAA) che rileva la presenza di attività antivirale totale. La TAA infatti e' valutata come la capacità dei PBMC delle scimmie vaccinate con il DNA del plasmide pCVTat, coltivati in presenza di siero autologo, di resistere all'infezione con dosi scalari del virus (Tabella 29).

TABELLA 29

Analisi della presenza di attività antivirale totale (TAA)*

N° scimmia	Giorni dopo l'infezione	
	7	17
	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)
M9	10 ⁻²	>10 ⁻² **
M10	10 ⁻³	10 ⁻²
M11	>10 ⁻² *	>10 ⁻² *
M12	10 ⁻²	>10 ⁻² **

*Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 13. Le scimmie erano inoculate con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intramuscolare (M9-11) e la scimmia di controllo (M12) con 1 mg del plasmide pCV0. I PBMC erano prelevati alla settimana 44 dall'inizio della vaccinazione ed infettati in vitro con 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID50 di

SHIV 89.6P. I risultati sono espressi come la dose minima di SHIV (TCID₅₀/cellula) con la quale le cellule sono risultate infettabili.

*Nessuna coltura è risultata infettata alla concentrazione più alta di SHIV utilizzata nel saggio, corrispondente a 10^2 TCID₅₀/cellula. ** Le colture si negativizzavano in diciassettesima giornata.

I risultati in Tabella 30 dimostrano la presenza di attività antivirale solubile (CAF) mediata dai linfociti T CD8+ nelle scimmie vaccinate che, in questo protocollo risulta aumentata anche nella scimmia di controllo inoculata con il vettore vuoto (PCV-0).

TABELLA 30

*Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8+ (CAF)**

N° scimmia	Settimane dall'inizio della vaccinazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M9	0	21	14,6
	36	77	2,6
M10	0	40	13,8
	36	67	25
M11	0	49	19
	36	42	14
M12	0	65	23
	36	62	14

~~*Analisi della presenza di attività antivirale solubile prodotta dalle cellule~~

T CD8+ (CAF). I PBMC erano prelevati da 3 scimmie (M9-11) inoculate con 1 mg di DNA del plasmide pCV-Tat e dalla scimmia di controllo (M12) inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. Il saggio relativo all'infezione acuta era eseguito in cellule CEM x 174 infettate con il virus

H 02.03.99

SHIV, come descritto nella Tabella 7. Il saggio relativo all'infezione cronica era eseguito in cellule U1 cronicamente infettate con HIV-1; come descritto nella Tabella 14. I risultati sono espressi come percentuale (%) di inibizione della replicazione virale nelle cellule trattate con 5 μ l dei supernatanti dei linfociti T CD8+ rispetto alle cellule nontrattate.

La produzione di citochine (γ IFN, IL-4, $\text{TNF}\alpha$) e della chemochina Rantes era valutata alla 44^a settimana dai PBMC delle scimmie vaccinate con il DNA del plasmide pCVTat e dal controllo (Tabella 31).

TABELLA 31

Analisi della produzione di citochine e chemochine*

N° scimmia	Controllo				PHA				TT			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M9	-/-	-/3,5	-/-	-/-	312/204	-/-	250/-	536/2288	-/-	-/-	-/-	nd/nd
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/-	-/-	-/-	420/183	-/-	388/-	4336/3124	-/-	-/-	-/nd	nd/nd
M12	-/-	-/3,2	-/-	-/-	430/932	-/-	-/-	1938/2576	-/-	-/-	218/nd	nd/nd

N° scimmia	Tat (1 µg)				Tat (5 µg)			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/4	-/-	544/368	-/-	-/3,5	-/-	2124/-
M12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

*Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 15. Le scimmie erano vaccinate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del Smide pCVTat (M9-11) e la scimmia di controllo era inoculata con il DNA del plasmide pCV0. I PBMC erano prelevati alla settimana 44 dall'inizio della vaccinazione. I risultati sono riportati come valori (pg/ml) delle citochine o di Rantes a 48 e 96 ore (48/96) rispettivamente. (-), i valori erano inferiori ai valori di cut off. I valori di cut off (pg/ml) erano: γIFN, 31.2; IL-4, 3.12; TNFα, 15.6; Rantes, 62.5. nd, non determinato

I risultati dimostrano la presenza di una debole reazione allo skin test

in una scimmia (M9) alla 11^a settimana (Tabella 32).

TABELLA 32
Skin test al Tat^a

N° scimmia	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione						
	11	15	21	28	32	36	44
M9	+/-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-
M12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano

inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli

animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a,

15^a, 21^a, 28^a, 32^a, 36^a e 44^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale.

Le scimmie (M9-11) erano state vaccinate per via intramuscolare con 1

mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era

inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. La comparsa di un

nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di

ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-,

eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.

I risultati post-challenge indicano che tutti gli animali vaccinati erano

protetti dall'infezione con 10 MID₅₀ di SHIV89.6P, come indicato dai

tests virologici (antigenemia plasmatica, determinazione delle copie di

DNA provirale, citoviremia) risultati tutti negativi (Tabella 33). Inoltre la

presenza di anticorpi anti-SIV nella scimmia M11 indicavano l'avvenuta esposizione al virus o un'infezione abortiva al virus inoculato. Al contrario, nelle altre scimmie non ci sono ancora titoli anticorpali rilevabili e si procederà alla determinazione degli anticorpi prodotti in vitro, ed eventualmente, alla determinazione della risposta proliferativa linfocitaria ad antigeni di SIV. Qualora l'esito di questi esami fosse negativo, le scimmie saranno inoculate con una dose maggiore del virus in quanto anche la scimmia di controllo M12 e' risultata resistente all'infezione. Questa scimmia era stata vaccinata con il vettore pCV0 vuoto. Dati recenti in letteratura hanno dimostrato il ruolo adiuvante svolto da certe sequenze di DNA che sono assai più frequenti nei batteri che nelle cellule eucariotiche e che, alla pari del lipopolisaccaride e del mannosio, costituiscono un forte stimolo per l'immunità naturale [Roman et al., Nature Med 3:849 (1997)]. Pertanto, esiste la possibilità che la protezione osservata nella scimmia M12 sia da mettere in relazione ad una generica attività antivirale indotta da tali sequenze batteriche in grado di indurre produzione di IFN α , IFN β , IL-12 ed IL-18, con funzioni immunomodulatorie ed antivirali. Ciò è avvalorato dalla presenza in questa scimmia di attività antivirale TAA (Tabella 29) e CAF (Tabella 30) in assenza di immunità umorale o cellulare specifica per Tat. Infatti questi saggi misurano anche attività

H 02.03.99

antivirali non antigene specifiche. Ciò e' confermato dall'infezione della scimmia M13 inoculata con una dose di virus 3.5 volte inferiore a quella utilizzata per il challenge della scimmia M12 (Tabella 33). Sulla base di questo risultato l'inventore si propone di utilizzare come adiuvante il vettore pCV0, o parti di esso.

TABELLA 33

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con il virus SHIV 89.P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg) ^b	Cito- viremi a ^c	IgG Anti- SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg)	citov iremi a	IgG Anti- SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg)	citovir emia	IgG Anti- SIV ^d
M9	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M10	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M11	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	Neg
M12	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600	<20	43	ND	1:3200

I saggi erano eseguiti come descritto nella legenda della tabella 17. Le scimmie (M9-11) erano state vaccinate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era stata inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P.

La determinazione al FACS della percentuale e del numero assoluto dei linfociti CD4 e CD8 (Tabella 34) confermava il dato virologico. Infatti un significativo decremento del numero dei CD4 si osservava al

H 02.03.99



giorno 15 e 60 post-challenge solo nella scimmia di controllo M13 risultata infetta in base alla positivita' dei tests di antigenemia plasmatica, di rilevamento di DNA provirale, e di isolamento virale (Tabella 33).

TABELLA 34

Analisi al FACS dei linfociti CD4+ e CD8+

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con SHIV 89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cellule/ μ)			(cellule/ μ)			(cellule/ μ)			(cellule/ μ)		
	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+
M9	21,5 (1500)	37,6 (2630)	0,57	ND	ND	ND	26,4 (1340)	51,6 (2610)	0,51	30,6 (2000)	45,5 (2980)	0,67
M10	39,5 (1050)	36,3 (960)	1,1	ND	ND	ND	34,8 (1730)	41,8 (2080)	0,83	31,6 (3760)	52,2 (6200)	0,61
M11	35,8 (1080)	37,7 (1140)	0,95	ND	ND	ND	28,7 (1330)	36,7 (1710)	0,78	24,5 (890)	48,7 (1770)	0,5
M12	30,9 (1860)	46 (2760)	0,67	ND	ND	ND	26,7 (1300)	49,6 (2420)	0,54	23,7 (2620)	52,1 (5760)	0,45
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

L'analisi era eseguita come descritto nella legenda della tabella 18. Le scimmie (M9-11) erano state vaccinate per via intramuscolare con 1 mg

di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P.

Questi risultati dimostrano che la vaccinazione con il DNA del plasmide pCVTat era ben tollerata dagli animali e non era tossica, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione a DNA ottenuti nel primo esperimento pilota. Questi dati confermano l'osservazione riportata nel primo esperimento, e forniscono ulteriori evidenze che il DNA del plasmide pCVTat induce una risposta umorale (seppure più modesta rispetto a quella indotta dall'immunizzazione con la proteina Tat) e cellulare specifica anti-Tat con effetti antivirali, parte dei quali potrebbero essere dovuti a sequenze specifiche presenti nel vettore pCV0 che potrebbero fungere da adiuvanti vaccinali.

Saranno valutati anche protocolli di immunizzazione in cui saranno inclusi combinazioni dei DNA esprimenti gli altri geni di HIV-1 e/o citochine, descritti nell'esempio 3. In questi esperimenti si utilizzeranno per il challenge virus SHIV contenenti i geni tat, rev e nef di HIV [Shibata et al., J. Virol. 65:314 (1991); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994); Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995); Reinmann et al., J. Virol. 71:98 (1996)].

I DNA dei plasmidi pCV0 e pCVTat saranno inoculati negli animali utilizzando altri sistemi di "delivery" che potrebbero rendere più efficace l'immunizzazione, quali l'uso di liposomi, nanoparticelle, eritrociti, "gene gun" o tramite l'utilizzo di vettori erpetici come descritto nell'Esempio profetico 9 e 10.

Esempio 6. Vaccinazione terapeutica

Al fine di valutare gli aspetti di sicurezza e di tossicità del vaccino anti-Tat in soggetti già infetti e' stato disegnato un protocollo di vaccinazione terapeutica anti-Tat, sia proteica che a DNA, in scimmie infettate con dosi scalari di SHIV 89.6P e con immunodeficienza (AIDS). Lo stock virale utilizzato per l'infezione era ottenuto dalla milza e dai linfonodi di una scimmia cynomolgus infettata 14 giorni prima. I linfociti, purificati dai tessuti mediante disgregazione meccanica, venivano suddivisi in due aliquote alla concentrazione di $1.5 \times$

10^6 cellule/ml. Una aliquota era depletata dei linfociti T CD8+ mediante l'uso di biglie paramagnetiche (Dynal, Norvegia). Entrambe le colture erano stimulate con PHA ($1 \mu\text{g/ml}$) per tre giorni e quindi seminate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml in presenza di IL-2 (50 U/ml). La

presenza di virus nel supernatante era determinata mediante la ricerca della trascrittasi inversa (RT) nel terreno di coltura, prelevato ad intervalli di tre giorni, utilizzando 1 ml del supernatante delle colture

H 02.03.99

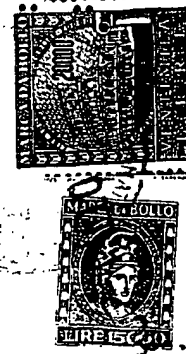
cellulari, chiarificato e ultracentrifugato per 11 min. a 100.000 rpm a + 4° C (ultracentrifuga Beckman TL-100). Il pellet ottenuto era lisato e 30 µl erano addizionati alla miscela di reazione (TRIS HCl 1M, pH 8; MgCl₂, 0.5 M; KCl 1M; Poly A 1mg/ml; oligo-dT 12-18 100 µg/ml; DTT 0.02 M; 1,2 ³H-Metil timidina trifosfato 1mCi/ml) ed incubati a 37° C per 60'. La reazione era terminata con 500 µl di Na Pirofosfato 0.1 M pH 5 e 600 µl di acido tricloroacetico (TCA) 20% ed il campione era raccolto su filtro da 0.45 µm (Millipore) e letto al β-counter dopo aggiunta di 5 ml di liquido di scintillazione (Filter Count, Packard).

I terreni che contenevano valori di RT maggiori a 20.000 cpm erano centrifugati e addizionati del 10% di siero umano di gruppo AB. Il virus era concentrato mediante centrifugazione a 30.000 rpm (90' a 4° C), risospeso in RPMI 1640 contenente il 10% di siero umano (gruppo AB), aliquotato e conservato in azoto liquido. Lo stock virale era titolato in vitro nelle linee umane CEM x 174 e C8166 (3×10^3 TCID₅₀/cellula), e in vivo nelle scimmie cynomolgus ($3.17 \times 10^{5.69}$ MID₅₀/ml).

E' stato iniziato un primo esperimento pilota in cui 7 scimmie sono state infettate per via endovenosa con lo SHIV89.6P preparato come

appena descritto. Ciascuna scimmia riceveva 1 ml di SHIV diluito in soluzione fisiologica contenente il 2% di siero umano (gruppo AB, Rh -)

H 02.03.99



secondo il seguente schema. Una scimmia (IM1) era inoculata con la diluizione 1:500; due scimmie (IM2, IM3) ricevevano la diluizione 1:5.000; due scimmie (IM4, IM5) erano inoculate con la diluizione 1:50.000; una scimmia (IM6) era inoculata con la diluizione 1: 500.000; una scimmia (IM7) era inoculata con la diluizione 1: 5.000.000. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue al giorno -7 antecedente l'infezione con lo SHIV per la determinazione dei parametri di base. Campioni di siero e di plasma erano congelati a -20° C o -80° C ed utilizzati successivamente per risospendere l'inoculo proteico. Al tempo 0 tutte le scimmie erano inoculate con lo SHIV89.6P. Le scimmie erano controllate giornalmente. Inoltre, al tempo 0 e alle settimane 2 e 4 dopo l'infezione erano prelevati 10 ml di sangue per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina) e l'analisi dei parametri immunologici e virologici, quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. Alla 4^a settimana dopo l'infezione, 6 scimmie (IM1-6) risultavano infettate. La scimmia IM7 che aveva ricevuto la diluizione 1: 5.000.000 di SHIV non risultava infettata (Tabella 35).

TABELLA 35

Analisi della presenza di SHIV 89.6P in scimmie infettate con diverse diluizioni del virus

N° scimmia	Diluizione SHIV 89.6P	Settimane dopo l'infezione					
		0		2		4	
		Isolamento virale ^a	p27 (pg/ml) ^b	Isolament o virale ^a	p27 (pg/ml)	Isolamento virale ^a	p27 (pg/ml)
IM1	1:500	ND	ND	+	>450	+	47
IM2	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	161,8
IM3	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	6,67
IM4	1:50.000	ND	ND	+	<20	+	>450
IM5	1:50.000	ND	ND	+	>450	+	166,7
IM6	1:500.000	ND	ND	+	>450	+	0
IM7	1:5.000.000	ND	ND	-	0	-	0

^aL'isolamento del virus e ^bla p27 plasmatica (pg/ml) erano effettuati

come descritto nella legenda della tabella 17. Le scimmie erano inoculate con diluizioni crescenti dello stock virale per via endovenosa come descritto nel testo.

Dopo 7 settimane dall'infezione gli animali infettati che già mostravano gravi segni di immunodeficienza erano vaccinati con la proteina Tat e il

DNA del plasmide pCVTat secondo il seguente schema. Le scimmie IM1, IM3, IM5 e IM6 ricevevano la proteina Tat (20 µg), risospesa in 250 µl di PBS-A contenente lo 0.1% di BSA e il 20% di plasma autologo e 250 µl di adiuvante Alum, per via sottocutanea in un sito nel

dorso, e il DNA del plasmide pCVTat (1 mg), risospeso in 1 ml di PBS-A, per via intramuscolare in un sito, distinto dal precedente, nel dorso.

Le scimmie IM2 e IM4 (controllo) erano inoculate con 250 µl di Alum e

250 µl di PBS-A, contenente lo 0.1% di BSA e il 20% di plasma autologo, per via sottocutanea in un sito del dorso, e con il DNA del plasmide pCV0 (1 mg), risospeso in 1 ml di PBS-A, per via intramuscolare in un sito del dorso, distinto dal precedente. La scimmia IM7, non essendo stata infettata, non era sottoposta a vaccinazione. Le scimmie erano vaccinate al tempo 0 (corrispondente alla 7^a settimana dopo l'infezione con SHIV) e dopo 1, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 17 e 18 settimane. Per valutare gli effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia, ciascun animale era osservato giornalmente per la comparsa di segni apparenti di malattia, e inoltre da ogni scimmia erano prelevati 10 ml di sangue al tempo 0 e alla settimana 3, 8, 12, 16 e 21 dall'inizio della vaccinazione, per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina), per la valutazione dei parametri immunologici, quali la presenza di immunoglobuline specifiche, i livelli di citochine del tipo Th1 e Th2, la produzione di chemochine, per la caratterizzazione del fenotipo linfocitario (CD4, CD8, CD28, CD40, CD86, CD20, CD2, CD26, CD20), e per l'analisi dei parametri virologici, quali la presenza di DNA virale nelle cellule con PCR semiquantitativa, la viremia plasmatica con RT-PCR competitiva, l'antigenemia plasmatica (p27 Gag) mediante saggi ELISA e la presenza di anticorpi contro gli

antigeni di SHIV come descritto negli esempi precedenti. La somministrazione di altri richiami sarà stabilita sulla base dei risultati clinici, virologici ed immunologici. Dopo l'ultima inoculazione il monitoraggio avverrà con frequenza mensile ed ogni qualvolta siano apparsi segni indicanti un repentino cambiamento del quadro clinico. Campioni di PBMC, siero, plasma ed urine verranno congelati ad ogni controllo per successive valutazioni come descritto in precedenza.

I risultati attualmente disponibili di questo esperimento, relativi alla 8^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nei controlli non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione, ne' di sintomi generali nelle scimmie asintomatiche o di modificazioni della sintomatologia in animali già sintomatici. Inoltre, non si sono osservati effetti transattivanti la replicazione virale. Infatti, i dati ottenuti indicano la mancanza sia di effetti tossici sia di aumento della replicazione virale negli animali vaccinati (Tabella 36).

TABELLA 36

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Settimane dall'inizio della vaccinazione					
	0		3		8	
	p27 (pg/ml)	DNA PCR N° copie/μg	p27 (pg/ml)	DNA PCR N° copie/μg	p27 (pg/ml)	DNA PCR N° copie/μg
IM1	12,3	68	17,3	52	141	41

H O



IM3	0	61	0	48	0	71
IM5	97,1	20	21,7	15	23,6	95
IM6	0	43	0	55	0	24
IM2	21,2	ND	36,6	53	27,4	78
IM4	81	195	22	288	15,4	135
IM7	ND	ND	ND	ND	0	>1

I saggi sono stati determinati come descritto nella Tabella 17. Le scimmie IM1, IM3, IM5 e IM6 erano inoculate con la proteina Tat (20 μ g) e Alum per via sottocutanea e con il PCVTat (1mg) per via intramuscolare. Le scimmie IM2 e IM4 (controlli) erano inoculate con Alum per via sottocutanea e con il PCV0 (1 mg) per via intramuscolare. IM7 era una scimmia di controllo non infettata e non vaccinata.

L'analisi al FACS indicava che il numero dei linfociti CD4+ e CD8+ non variava significativamente dopo vaccinazione (Tabella 37).

TABELLA 37

Analisi al FACS del numero dei linfociti CD4+ e CD8+

N° Scimmi a	Tempo 0			Settimane dall'inizio della vaccinazione								
				0			3			8		
	%			%			%			%		
	(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/ CD8	CD4	CD8	CD4/ CD8	CD4	CD8	CD4/ CD8
IM1	25,39 (1264)	36,8 (1831)	0,69	3,3 (101)	64,16 (1963)	0,05	2,32 (52)	63,34 (1431)	0,04	3,41 (96)	55,41 (1559)	0,06
IM3	19,26 (869)	26,45 (1193)	0,73	2,84 (74)	58,22 (1526)	0,05	3,21 (92)	58,16 (1663)	0,05	3,18 (91)	50,12 (1434)	0,06
IM5	24,75	58,04	0,42	2,28	57,3	0,04	2,89	55,6	0,05	2,15	54,3	0,04

	(580)	(1361)		(38)	(946)		(48)	(917)		(60)	(1527)	
))	
IM6	40,46 (2590)	39,74 (2544)	1,01	3,12 (111)	62,3 (2225)	0,05	2,75 (138)	65,40 (3290)	0,04	2,3 (73)	52,18 (1659)	0,04
)))))	
IM2	42 (1787)	34,7 (1476)	1,21	2,41 (68)	58,12 (1632)	0,03	2,7 (121)	57,6 (2580)	0,05	1,89 (66)	50,6 (1763)	0,04
)))))	
IM4	30,72 (1589)	27,76 (1680)	1,10	2,12 (113)	61,13 (3248)	0,03	1,92 (90)	60,3 (2828)	0,03	3,12 (164)	53,12 (2790)	0,06
)))))	
IM7	17,02 (871)	55,8 (2857)	0,30	ND	ND	ND	20,26 (770)	51,40 (1957)	0,39	24,1 (868)	50,43 (1842)	0,48
))))	

L'analisi era eseguita come descritto nella legenda della Tabella 18. Le scimmie IM1, IM3, IM5 e IM6 erano inoculate con la proteina Tat (20 µg) e Alum per via sottocutanea e con il PCVTat (1mg) per via intramuscolare. Le scimmie IM2 e IM4 (controlli) erano inoculate con Alum per via sottocutanea e con il PCV0 (1 mg) per via intramuscolare. IM7 era una scimmia di controllo non infettata e non vaccinata.

Cio' conferma che la proteina Tat e il DNA del plasmide pCVTat erano ben tollerati dagli animali infettati e non erano tossici alle dosi somministrate e per le vie di inoculazione utilizzate e non aumentano la replicazione virale negli animali infettati.

Esempio 7.

La costimolazione con biglie anti-CD3/28 di linfociti CD4+ purificati da scimmie infette con SIV+ induce l'espansione

**logaritmica del numero delle cellule in assenza di significativa
replicazione e propagazione del virus.**

Le cellule del sangue periferico sono state deplete della sottopopolazione CD8+ mediante l'impiego di biglie paramagnetiche anti-CD8 (Dynal, Oslo; Dynabeads M-450 CD8) e la purezza delle popolazioni ottenute è stata valutata tramite l'analisi citofluorimetrica e considerata accettabile se maggiore del 95%. Le cellule CD8 deplete (denominate CD8-PBMC) sono state messe in coltura e stimulate con PHA (2µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o con biglie paramagnetiche previamente coniugate con due anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD3 (Clone FN18, Biosource) e CD28 (Clone 9.3) (biglie anti-CD3/28). Allo scopo di facilitare il legame con le biglie anti-CD3/28 l'incubazione è avvenuta su un dispositivo rotante e le cellule coniugate, selezionate con l'ausilio di un magnete, sono state

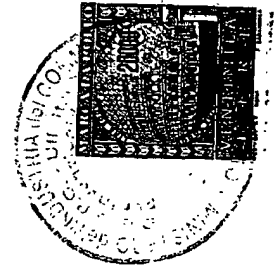
denominate CD8-CD3+CD28+ e poste in coltura. La concentrazione delle cellule è stata riportata a quella di partenza 3 volte a settimana ed è stata aggiunta IL-2 ove indicato; inoltre per quanto riguarda le cellule stimulate con biglie anti-CD3/28, esperimenti preliminari hanno dimostrato la convenienza dell'utilizzo di un regime di stimolazione continua ripristinando il rapporto ottimale biglie:cellule ad ogni conta eseguita. Nostri studi hanno infatti dimostrato che in assenza di IL-2

esogena la sottopopolazione CD8-CD3+CD28+ prolifera significativamente meglio delle cellule CD8-PBMC in risposta alla costimolazione con biglie anti-CD3/28 e che l'aggiunta di IL-2 (40 U/mL, 3 volte alla settimana) migliora significativamente la cinetica di proliferazione sia per durata che per numero di cellule ottenute (figura 14).

Allo scopo di valutare l'attività antivirale, cellule CD8-CD3+CD28+ purificate da 4 animali non infettati sono stati infettate al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIV e mantenute in condizioni di stimolazione continua; come controllo sono stati impiegati CD8-PBMC stimolati con PHA e IL-2. L'andamento dell'infezione è stato monitorato mediante determinazione dell'antigene virale p27 Gag nei sovrinatanti delle colture utilizzando un kit ELISA commerciale (Coulter, Hialeah, FL). I livelli di p27 (ng/ml) misurati al giorno 6 e 12 dopo l'infezione e riportati

in figura 15 hanno indicato una netta differenza fra le due condizioni di stimolazione in termini di produttività dell'infezione. Infatti al giorno 6 la riduzione percentuale della p27 rispetto ai campioni stimolati con PHA e IL-2 era compresa fra il 40% e l'87% e al giorno 12 tale riduzione era incrementata in 2 soggetti su 4 indicando una minore permissività delle cellule all'infezione virale. In un solo caso (MK 9401) abbiamo registrato la propagazione dell'infezione anche nella condizione di

H 02:03



stimolazione con biglie anti-CD3/28. I risultati descritti dimostrano che il *Macacus fascicularis* rappresenta un buon modello per la espansione ex vivo di sottopopolazioni linfocitarie in assenza di significativa replicazione virale mediante costimolazione con biglie anti-CD3/28 e costituisce il razionale per un vaccino terapeutico basato sulla espansione e reinfusione, in soggetti infetti con HIV, di linfociti autologhi specifici per gli antigeni virali proposti.

Esempio 8

Uso delle cellule dendritiche a scopi vaccinali

Le cellule dendritiche (DC) ed in minore misura i macrofagi sono in grado di presentare efficacemente gli Ag ai linfociti T ed indurre la proliferazione o l'acquisizione di specifiche attività citotossiche. Tali cellule sono dette pertanto "cellule presentanti l'Ag" (APCs) e sono in grado di iniziare la risposta immune. DC possono, quindi, essere utilizzate in protocolli di immunizzazione *ex vivo*. A tali scopi, i precursori delle DC erano isolati dal sangue periferico di *Macaca fascicularis* mediante coltura *in vitro* delle cellule aderenti con GM-CSF e IL-4 per 7 giorni, oppure mediante purificazione di cellule CD34⁺ con metodiche immunomagnetiche e successiva coltura *in vitro* con GM-CSF e TNF- α per 14 giorni. L'analisi morfologica e la caratterizzazione fenotipica (FACS analisi e immunoistochimica) erano condotte per

confermare l'identità delle cellule ottenute in coltura. L'analisi funzionale si basa sulla capacità delle DC di indurre la proliferazione di linfociti allogenici che è una caratteristica distintiva di queste cellule.

I dati finora ottenuti confermano la messa punto della purificazione e della caratterizzazione funzionale delle DC, mentre la fenotipizzazione delle cellule è parziale per la limitata cross-reattività degli anticorpi monoclonali diretti contro marcatori di lineaggio umani con quelli di scimmia. In particolare, per quanto concerne la metodica di isolamento dei precursori di DC, PBMC ottenuti dopo stratificazione su gradiente di Ficoll, venivano ulteriormente stratificati su gradiente discontinuo di Percoll (50% e 42,5 %). La frazione cellulare che, dopo centrifugazione a 500 g per 30', si poneva all'interfaccia fra i due gradienti era costituita prevalentemente da cellule di tipo monocitario (come confermato dall'analisi al FACS, risultati non mostrati) che, tenute a 4° C per evitarne l'aderenza alla plastica, venivano raccolte, lavate, contate e messe in coltura a 37° C. Il giorno successivo le cellule non aderenti erano rimosse mediante 4 lavaggi delicati. Alle cellule aderenti veniva aggiunto terreno completo addizionato di GM-CSF (200 ng/ml, Leucomax, Sandoz, Milano, Italia) ed IL-4 (200 U/ml, Pepro Tech, London, England) per indurre la differenziazione in DC, o terreno completo in assenza di citochine per consentire il normale

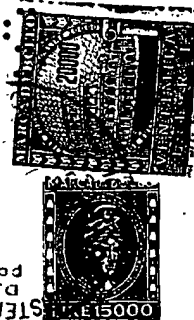
differenziamento dei monociti in macrofagi. Ogni 3-4 giorni metà del terreno veniva sostituito con terreno nuovo identico per composizione a quello utilizzato al giorno 0. La maturazione in DC della frazione cellulare trattata con citochine veniva verificata con l'acquisizione delle caratteristiche morfologiche tipiche delle DC quali la clusterizzazione, la perdita dell'aderenza, lo sviluppo di propaggini. Le cellule monocito-macrofagiche aderenti lasciate in coltura senza l'aggiunta di citochine venivano trattate con EDTA (0,5 mM in PBS senza calcio e magnesio) per staccarle dalla plastica, lavate due volte, contate e risospese in terreno e concentrazione ottimale a seconda del test da effettuare. Per gli esperimenti di coltura mista leucocitaria allogeneica (AMLR), le APCs ottenute (DC o Macrofagi) erano cimentate con numeri fissi di linfociti T allogenici purificati su gradiente di Ficoll, Percoll ed aderenza ed in seguito congelati. La AMLR veniva eseguita in piastre da 48 pozzetti con 0.5×10^6 linfociti T e APCs in numero variabile. Al quarto giorno di coltura aliquote fisse di sospensione cellulare venivano piastrate in triplicato per ciascuna condizione in piastre da 96 pozzetti; 1 μ Ci di timidina tritiata veniva aggiunta a ciascun pozzetto e la piastra lasciata incubare per 16 ore. Al termine dell'incubazione si procedeva alla valutazione della quantità di timidina incorporata [conte per minuto (cpm)] dalle cellule tramite lettura ad un contatore a scintillazione. I

risultati ottenuti indicano che le DC così ottenute hanno potente funzione APC come dimostrato dalla loro capacità di indurre proliferazione di linfociti umani se comparata a quella dei macrofagi (Figura 16 A), e di indurre la proliferazione di linfociti T di scimmia a tutte le concentrazioni usate (Figura 16 B).

Per quanto concerne l'utilizzo delle DC per la vaccinazione, le DC, risospese alla concentrazione di $1 \times 10^5/100$ ml in RPMI 1640 contenente il 5% di siero autologo, 10 mM di HEPES buffer, 100 U/ml di penicillina-streptomicina, 0.5 mg/ml di amfotericina B, e glutammina allo 0.03% saranno incubate per 2 ore a 37° C in presenza di Tat o di suoi peptidi o delle combinazioni Tat, Rev, Nef, Gag e/o citochine e successivamente inoculate 2 o più volte a distanza di 2-4 settimane per via endovenosa. Alternativamente, le cellule dendritiche verranno trasdotte con vettori contenenti il gene tat da solo o associato con gli altri vettori summenzionati e successivamente inoculate endovena.

Postilla 68: Pagina 59 della descrizione: Riga 1: dopo la parola "gordonii" **radiare** "commensale della cattività orale dell'uomo) e **inserire** "e Lactobacillus)".

Postilla 69: Pagina 59 della descrizione: Riga 7: dopo la parola "Vaccine" **radiare** "1997, in press] e **inserire:** "15:1330 (1997); Pozzi et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal



immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 35 (1997); Oggioni, et al., Gene 169:85 (1996); Rush, et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 107 (1997); Medaglini et al., Biothec. Annu. Rev. 3:297 (1997); Medaglini et al., Am. J. Reprod. Immunol. 39:199 (1998)]. Questi batteri funzionano come vettori vivi di vaccini, ed hanno il vantaggio di offrire una stimolazione prolungata del sistema immunitario. Verrà inoltre valutata la possibilità di coesprimere sulla superficie batterica Ag virali e molecole coadiuvanti la risposta immunitaria quali la subunità B della tossina termolabile di *E. coli* o citochine. Per la preparazione dei ceppi ricombinanti di *S. Gordonii* si seguirà la strategia precedentemente descritta [Oggioni et al., Vaccine 13:775 (1995)]. In breve: (i) integrazione cromosomica delle molecole di DNA ricombinante; (ii) fusioni trascrizionali con promotori cromosomici forti; (iii) fusioni traduzionali con il gene di una proteina streptococcica di superficie (proteina M6). I ceppi ricombinanti di *S. Gordonii* verranno utilizzati per colonizzare la mucosa vaginale delle scimmie. E' stato dimostrato che i ceppi ricombinanti di *S. Gordonii* che esprimono il V3 della gp120 e la proteina E7 di HPV-16 colonizzano in maniera stabile la mucosa vaginale del topo dopo un singolo inoculo, inducendo una risposta anticorpale Ag-specifica sia locale che

sistemica con prevalenza in quest'ultima di IgG2a, che suggerisce una risposta di tipo Th1 [Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997); Medaglini et al., Vaccine 15:1330 (1997)]. Saranno selezionati ceppi di lattobacilli vaginali umani che siano in grado di colonizzare la mucosa vaginale della scimmia e quindi si utilizzerà un sistema genetico, già sviluppato, che consente l'espressione di Ag eterologhi sulla superficie dei lattobacilli (Rush, 1997). La strategia utilizzata si basa su: (i) clonaggio delle fusioni geniche (*emm6*/gene eterologo) in vettori di inserzione che portano omologie con il trasposone coniugativo Tn916; (ii) trasformazione di questi vettori in ceppi batterici che fungono da ospite intermedio (*Bacillus subtilis*); (iii) mobilizzazione coniugativa dei trasposoni ricombinanti da *B. subtilis* a ceppi di *Lactobacillus*. I ceppi ricombinanti di *Lactobacillus* saranno utilizzati per colonizzare la mucosa vaginale dell scimmie.

Campioni vaginali verranno prelevati utilizzando speciali filtri assorbenti [Di Fabio et al., submitted; Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997); Medaglini et al., Vaccine 15:1330 (1997)]. La colonizzazione verrà valutata piastrando i campioni vaginali su piastre selettive e l'espressione degli Ag di HIV-1 ~~in vivo verrà valutata tramite~~ immunofluorescenza degli strisci vaginali assorbenti [Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997)]. Con metodiche già standardizzate

[Di Fabio et al., submitted], i campioni vaginali verranno utilizzati per i) analisi dello striscio vaginale tramite test di Papanicolaou, nel caso di vaccinazione vaginale; ii) presenza nelle cellule di antigeni vaccinali; iii) caratterizzazione fenotipica delle cellule mediante analisi citofluorometrica (CD1, CD2, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD20, CD28, CD40, CD25, HLA-DR); iv) valutazione della espressione di citochine (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-15, RT-PCR semiquantitativa), determinazione di citochine e chemochine nei liquidi mucosali, tramite saggi ELISA; v) dosaggio delle immunoglobuline (IgA, IgG) presenti nel fluido mucosale tramite ELISA [Di Fabio et al., Vaccine 15: 1 (1997)]. Verranno dosate in ciascun campione le immunoglobuline totali e specifiche. Un mese dopo l'ultima vaccinazione le scimmie saranno infettate per via endovenosa o mucosale con lo SHIV 89.6P. Il follow-up delle scimmie sarà effettuato

come descritto nell'Esempio 4. Verranno prelevati campioni di sangue per eseguire gli esami di laboratorio, la valutazione di parametri immunologici, umorali e cellulari, come descritto nell'Esempio 4."

Postilla 70: Pagina 59 della descrizione: Riga 9: dopo la parola

"scimmie" **radiare** "cynomolgus".

Postilla 71: Pagina 59 della descrizione: Riga 11: dopo la parola

"indotta" **radiare**: "con gli immunogeni proteici descritti sopra, " e

inserire "somministrando gli immunogeni proteici, descritti sopra, direttamente per via mucosale in presenza di adiuvanti, quali la tossina termolabile di *E. coli* e la tossina colerica, oppure".

Postilla 72: Pagina 59 della descrizione: Dopo l'ultima riga, andare a

capo e **inserire:** " L'inventore ritiene, inoltre, che vettori erpetici ricombinanti, esprimenti le proteine virali sopra descritte possano essere ottimi sistemi per indurre un'efficace immunità mucosale. Si utilizzeranno vettori virali ricombinanti del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) per esprimere proteine virali per l'induzione di una risposta sistemica (mediante immunizzazione cutanea, i.d.) e mucosale (per via orale, vaginale o nasale). Si utilizzeranno vettori erpetici non replicativi, apatogeni [Marconi et al., Proc. Natl. Acad. Sci 93:11319 (1996)]. Si sfrutta l'abilità di questi vettori di contenere estese sequenze esogene senza interferire nell'efficienza d'infezione [Glorioso

et al., Ann. Rev. Microbiol. 49:675 (1995); Huard et al. Gene Ther. 2:385 (1995)]. Si costruiranno vettori capaci di contenere più geni di HIV (regolatori, accessori e strutturali). L'immunità mucosale potrebbe richiedere l'uso di un vaccino somministrato oralmente, per via vaginale o nasale. I vettori erpetici possono essere interessanti per questi approcci vaccinali data la capacità di HSV-1 di essere somministrato in modo diretto per via mucosale [Bowen et al., Res. Virol. 143:269

H 02.03.99



(1992); Kuklin et al., J. Virol. 240:245 (1998)]. I virus ricombinanti saranno costruiti utilizzando un metodo a due steps che facilita l'inserzione di sequenze esogene nel genoma virale. Il primo step richiede l'inserzione di una cassetta di espressione con un gene reporter (β -galattosidase, LacZ) clonato nel sito di restrizione PacI, non presente nel genoma virale di HSV-1, fiancheggiato dalla desiderata sequenza target di HSV-1, usando la procedura standard di ricombinazione omologa per interrompere il gene di HSV-1. Il ricombinante viene selezionato per la formazione di placche con un fenotipo blu, utilizzando "l'x-gal staining". La digestione del DNA virale con PacI porta al rilascio del gene marker e alla generazione di due grandi frammenti di DNA virale incapaci di produrre particelle virali infettanti. Il secondo step consiste in una co-trasfezione del DNA virale digerito con lo stesso plasmide usato per creare la delezione, dove il gene reporter è sostituito dal gene desiderato. I ricombinanti saranno identificati attraverso la selezione di placche con un fenotipo bianco dopo colorazione con x-gal. Questa ricombinazione porterà anche alla eliminazione dei siti PacI permettendo di usare questo metodo ripetutamente per inserire molti geni in diversi loci del genoma virale di HSV-1 [Krisky et al., Gene Ther. 4:1120 (1997)]. L'incrocio dei diversi vettori contenenti i singoli geni permetterà di creare geneticamente

H 02.03.99

tutte le diverse combinazioni. Attraverso lo screening con diversi markers, fenotipi e crescita selettiva su cellule completanti sarà possibile isolare il vettore contenente tutti i geni desiderati. Tutte le combinazioni saranno quindi create con l'alternarsi di trasfezioni di DNA e ricombinazioni di virus.

Saranno costruiti vettori esprimanti i singoli geni tat, rev, nef o gag, utilizzando come vettore di base quello contenente le mutazioni nei geni 4-/22-/27-/41-, che è considerato superiore in termini di ridotta tossicità ed estesa espressione del gene esogeno, rispetto ad altri vettori HSV-1 non replicativi. Saranno usati promotori costitutivi quali HCMV (human cytomegalovirus immediate early promoter), l'ICP0 lep (infected cell protein immediate early promoter) ed il Moloney Murine Leukemia virus LTR, per indurre l'espressione dei geni sopra menzionati.

Saranno costruiti vettori HSV-1 non replicativi esprimanti proteine di HIV in diverse combinazioni. La produzione di questi virus contenenti più geni sarà realizzata tramite un crossing over genetico dei vettori contenenti i singoli geni descritti nel punto precedente. Saranno creati doppi, tripli e quadrupli vettori.

I vettori saranno utilizzati per l'inoculazione nelle scimmie i.d. o per via mucosale (orale, vaginale o nasale) con particolare attenzione a

quest'ultimo tipo di somministrazione [Bowen et al., Res. Virol. 143:269 (1992); McLean et al., J. Infect. Dis. 66:341 (1994) e Vaccine 14:987 (1996)]. Lo schema di vaccinazione prevede inoculi multipli ad intervalli di tempo da determinare a seconda dell'immunogeno o della combinazione di immunogeni. Durante l'immunizzazione gli animali saranno monitorati per la valutazione dei parametri ematochimici e immunologici come descritto nell'Esempio 4. Con metodiche già standardizzate (Di Fabio et al., submitted), verranno prelevati campioni vaginali che saranno studiati come descritto precedentemente in questo Esempio.

Esempio profetico 10.

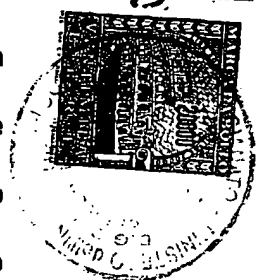
Sistemi di delivery

Tat (proteina e/o DNA) da sola o in combinazione con gli altri sopra descritti verrà inoculata utilizzando nuovi sistemi di delivery, quali eritrociti o nanoparticelle.

Per quanto riguarda gli eritrociti come sistemi di delivery, la procedura proposta si basa sulla possibilità di veicolare antigeni legati sulla membrana di eritrociti autologhi. Gli eritrociti, alla fine della loro vita (nell'uomo 120 giorni), sono rimossi dal circolo dalle cellule del sistema macrofagico, notoriamente professioniste della presentazione dell'antigene. Questa proprietà può essere opportunamente sfruttata a

scopi vaccinali. Pertanto, si utilizzerà una tecnica che permette di legare l'antigene sulla membrana degli eritrociti [Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 16: 188 (1992); Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 20: 335 (1994)], e di conservarne le sue capacità immunogeniche [Chiarantini et al., Vaccine 15: 276 (1997); Chiarantini et al., Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 235 (1998)]. Tramite tale procedura, gli eritrociti possono essere biotinilati senza essere danneggiati e senza alterare significativamente la loro sopravvivenza in circolo [Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 16: 188 (1992)]. Gli eritrociti biotinilati possono funzionare come carrier per immunogeni quando questi siano opportunamente biotinilati. Gli eritrociti così modificati circolano normalmente fino a quando non sono rimossi dal sistema macrofagico che presenterà l'antigene inducendo una risposta immune. La conseguente produzione di anticorpi opsonizzerà gli eritrociti leganti l'antigene accelerandone la rimozione dal circolo. I principali vantaggi di tale metodica sono riconducibili alla ridotta quantità di antigene necessaria per indurre una risposta umorale e cellulare, alla possibilità di una immunizzazione protratta per tutto il periodo di permanenza in circolo dell'eritrocita legante l'antigene e ad un effetto adiuvante esercitato dal sistema stesso. E' stato infatti dimostrato negli animali da esperimento che la somministrazione dello

H 02 03 00



stesso antigene legato sulla membrana di eritrociti autologhi induce una risposta immunitaria negli animali uguale o superiore a quella ottenuta con l'uso dell'adiuvante di Freund [Chiarantini et al., *Vaccine* 15: 276 (1997)]. Queste proprietà sono estremamente utili per lo sviluppo di un vaccino anti-HIV; in particolare quando sia necessario incrementare l'immunogenicità dell'antigene, quando la disponibilità dell'antigene costituisca un fattore limitante e quando, in particolare, si voglia ottenere una vaccinazione con un ridotto numero di immunizzazioni. Inoltre tale strategia potrà essere importante qualora si voglia evitare la somministrazione di un adiuvante. Infatti, è stato dimostrato, nel modello murino, che la somministrazione di antigene mediante eritrociti autologhi produce risposte immunitarie uguali o superiori a quelle ottenute con il più forte adiuvante in commercio (adiuvante di Freund) [Chiarantini et al., *Vaccine* 15: 276 (1997)], che, in aggiunta, non può essere utilizzato nell'uomo a causa dei suoi effetti collaterali. Pertanto si potrà valutare nei primati non umani l'effetto adiuvante di eritrociti leganti la proteina Tat da sola o in combinazione con gli altri immunogeni descritti precedentemente utilizzando come riferimento le risposte immunologiche ottenute con la somministrazione degli stessi immunogeni con Alum, RIBI o ISCOM.

Un'ulteriore strategia di delivery è rappresentata dalle nanoparticelle.

Nanoparticelle funzionali rappresentano sistemi estremamente interessanti per il trasporto ed il rilascio controllato di proteine e DNA [Chavany et al., Phar. Res. 9: 441 (1994); Zobel et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 483 (1997)] in quanto possono essere realizzate con elevato grado di affinità nei confronti di queste molecole biologicamente attive. Le nanosfere sono particelle polimeriche colloidali, di differente composizione chimica, variabili in grandezza da 10 a 1000 nm. Alla superficie, o al loro interno, è possibile adsorbire sostanze di diversa natura (oligonucleotidi, farmaci, proteine, peptidi, DNA) che vengono in tal modo veicolate nel citoplasma o nel nucleo della cellula dove sono rilasciate gradualmente. Queste proprietà, inoltre, permettono di utilizzare quantità estremamente basse di sostanza. Le nanoparticelle costituiscono quindi un ottimo sistema di

delivery soprattutto per quelle sostanze che, per loro natura, sarebbero instabili nell'ambiente intracellulare o di cui si voglia aumentare l'efficacia o la veicolazione verso cellule specifiche.

L'inventore ritiene che nanosfere possano essere con efficacia utilizzate come sistema di delivery degli antigeni virali sopra descritti.

E' possibile preparare e caratterizzare tre tipi di nanosfere progettate per la veicolazione ed il rilascio controllato di DNA (nanosfere tipo 1 e

2) e proteine (nanosfere tipo 3). Per quanto riguarda la veicolazione di DNA, si possono preparare due tipi di nanosfere (nanosfere tipo 1 e 2).

Il primo tipo di nanosfere (nanosfere tipo 1) ha struttura a triplo strato costituita da uno strato più esterno a base di catene di poliossietilenglicole (PEG) che, sulla base di recenti studi sui sistemi stealth [Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1237: 99 (1995); Lasic et al., Chemical Reviews 95: 2601 (1995)], dovrebbero rendere le nanosfere invisibili alle cellule di Kupfer, uno strato più interno costituito da monomeri con caratteristiche di tensioattivi contenenti gruppi ammonici quaternari in grado di adsorbire reversibilmente il DNA attraverso un meccanismo di scambio ionico, ed un core interno a base di metilmetacrilato come monomero. Queste nanosfere si ottengono mediante polimerizzazione in microemulsione che prevede la polimerizzazione di un monomero vinilico o vinilidenico in presenza

di una miscela di tensioattivi reattivi, cioè in grado di partecipare alla polimerizzazione del monomero, di cui uno deve presentare un gruppo ammonico quaternario in grado di interagire con gli oligonucleotidi e l'altro deve presentare una lunga catena di PEG (M. Laus, It. Pat. BO97A 000641).

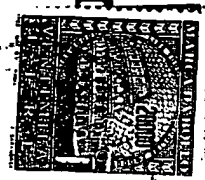
Il secondo tipo di veicolante del DNA è costituito da nano e microsfeere funzionali (nanosfere di tipo 2) con caratteristiche di idrogel. La

formazione di queste nanosfere dovrebbe avvenire in presenza della soluzione di DNA intrappolandolo così all'interno del veicolante.

Per quanto riguarda le proteine, si preparano delle nanosfere core-shell (nanosfere di tipo 3) costituite da un core interno di polimetilmetacrilato e da un guscio esterno fatto da un copolimero idrosolubile statistico di acido acrilico e di metilmetacrilato, caratterizzate da un elevato grado di affinità nei confronti delle proteine (Laus et al., Polymer 37: 343 (1996); Laus et al., Polymers for Adv. Techn. 7: 548 (1996)). Questo copolimero è commerciale (EUDRAGIT) ed è ottenibile con varie percentuali dei due comonomeri. Il processo di preparazione che porta all'ottenimento di questo secondo tipo di nanosfere, è costituito dalla polimerizzazione in dispersione. La sintesi prevede la polimerizzazione radicalica di un monomero vinilico o vinilidenico in presenza dell'EUDRAGIT che funge da stabilizzante sterico. Dopo la nucleazione delle nanosfere l'EUDRAGIT si dispone esternamente alle particelle. Variando quindi la concentrazione dell'iniziatore radicalico, il rapporto tra il monomero e l'EUDRAGIT ed il tempo di reazione, si ottengono vari campioni di nanosfere con caratteristiche morfologiche e chimiche variegate.

Pertanto si potrà valutare se Tat proteico o a DNA, da solo o in combinazione con gli immunogeni (proteici o a DNA) sopra citati,

H 02 03



veicolati da nanoparticelle siano in grado di indurre una risposta immune verso l'HIV, sia umorale che cellulo-mediata, più intensa o prolungata in paragone a quella indotta dagli immunogeni non veicolati nel modello della scimmia.

L'inventore ritiene che le informazioni derivanti da tali studi possano essere di estrema utilità per lo sviluppo di un vaccino anti-HIV. Inoltre, le informazioni derivanti dalla sperimentazione potranno essere trasferite anche ad altri studi vaccinali, in particolar modo quando vengano impiegate proteine o peptidi ricombinanti con bassa immunogenità. La possibilità di sviluppare uno schema vaccinale a singola somministrazione porterebbe incredibili vantaggi in termini di efficacia degli schemi vaccinali e alla riduzione dei costi di gestione di programmi di vaccinazione.

Postilla 73: Pagine 60 e 61 della descrizione: radiare tutte le rivendicazioni e sostituire con:

"1. Vaccino proteico o peptidico o a DNA, profilattico e/o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori, le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, comprendente la proteina Tat wild-type nella sua forma attiva e/o suoi mutanti e/o relative porzioni di proteina o peptidi, o il DNA codificante per dette proteine o dette porzioni o peptidi.

2. Vaccino secondo la riv. 1 in cui Tat ha la seguente sequenza nucleotidica (Seq. 1):

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3' e qualsiasi
altra variante di Tat di qualsiasi tipo o sottotipo di HIV.

3. Vaccino secondo la riv. 1 in cui Tat ha la seguente sequenza aminoacidica:

NH2-EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAISY
GRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH e
qualsiasi altra variante di Tat di qualsiasi tipo o sottotipo di HIV.

4. Vaccino secondo la riv. 1 in cui i mutanti sono scelti fra quelli aventi le seguenti sequenze nucleotidiche o parti di esse:

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante RGDΔ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGDΔ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

H 02.03.99

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA

ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

5. Vaccino secondo la riv. 1 in cui i mutanti sono scelti fra quelli aventi le seguenti sequenze amminoacidiche o parti di esse:

Sequenza amminoacidica del mutante cys22

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA

LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica lys41

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica del mutante RGD Δ

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica del mutante lys41-RGD Δ

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

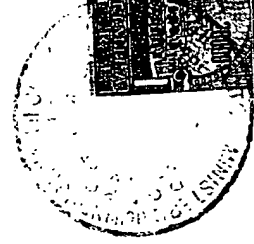
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

6. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le porzioni di Tat sono scelte fra le sequenze peptidiche

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

H 02 03 00



Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

7. Vaccino secondo le riv. 1-6 comprendente proteine o peptidi coniugati con l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper;

8. Vaccino secondo le riv. 1-7 in combinazione con proteine ricombinanti o peptidi di Nef, Rev o Gag di HIV, o loro parti.

9. Vaccino secondo la riv. 1 comprendente proteine di fusione Tat (wild type o suoi mutanti)/Nef, Tat (wild type o suoi mutanti)/Rev, Tat (wild type o suoi mutanti)/Gag o parte delle stesse.

10. Vaccino secondo le riv. 1-9 in combinazione con proteine ricombinanti di citochine immunomodulatorie o altre molecole, o parti delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale.

11. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le citochine sono IL-12 e/o IL-15.

12. Vaccino secondo la riv. 1 comprendente proteine di fusione Tat (wild type o suoi mutanti)/citochine immunomodulatorie, Tat (wild type o suoi mutanti)/IL12, Tat (wild type o suoi mutanti)/IL-15, Tat (wild type o

suoi mutanti)/altre molecole, o parte delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale.

13. Vaccino a DNA secondo le riv. 1, 2, 4 comprendente DNA codificante Tat wild-type o i suoi mutanti o parti di essi, inserito in un vettore di espressione.

14. Vaccino a DNA secondo le riv. 1, 2, 4 in combinazione con un vettore di espressione comprendente geni rev, nef e gag di HIV, o parte degli stessi.

15. Vaccino a DNA secondo le riv. 13 o 14 in cui il vettore è un plasmide co-esprimente tat (wild-type o i suoi mutanti)/rev, tat (wild-type o i suoi mutanti)/nef, tat (wild-type o i suoi mutanti)/gag o parti degli stessi.

16. Vaccino a DNA secondo le riv. 1, 2, 4 in combinazione con molecole a DNA inserite in un vettore di espressione codificante citochine immunomodulatrici o altri immunomodulatori, o parte degli stessi, potenzianti la risposta immune antivirale.

17. Vaccino a DNA secondo la riv. 16 in cui la citochina è IL-12 e/o IL-15.

18. Vaccino a DNA secondo le riv. 16 o 17 in cui il vettore è un plasmide co-esprimente tat (wild-type o suoi mutanti)/IL-12, tat (wild-type o suoi mutanti)/IL-15, tat (wild-type o suoi mutanti)/altre molecole, o loro parti, in grado di potenziare la risposta immune antivirale.

19. Vaccino secondo le riv. 13-18 in cui il vettore è pCV0.
20. Vaccino secondo le riv. precedenti comprendente cellule dendritiche autologhe tal quali e/o modificate secondo le riv. precedenti.
21. Vaccino secondo le riv. precedenti comprendente adiuvanti che ne potenzino la risposta immune.
22. Vaccino secondo la riv. 21 in cui l'adiuvante è scelto fra Alum, ISCOM, RIBI e relative miscele.
23. Vaccino secondo le riv. precedenti comprendente sistemi di veicolazione e di rilascio.
24. Vaccino secondo la riv. 23 in cui detti sistemi sono scelti fra nanoparticelle, vettori erpetici, globuli rossi, batteri e relative combinazioni.
25. Vaccino secondo la riv. 24 in cui i batteri sono scelti fra lo *Streptococcus gordonii* e il *Lattobacillus*.
26. Vaccino secondo le riv. 24 e 25 in cui i batteri sono ingegnerizzati per esprimere antigeni virali.
27. Vaccino secondo le riv. precedenti per l'immunizzazione di cellule del sangue periferico di soggetti infettati, che siano espanse tramite co-stimolazione con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 supportati su biglie paramagnetiche.

H 02.03.99

28. Vaccino terapeutico secondo le riv. precedenti, combinato con inibitori della replicazione virale.

29. Vaccino secondo le riv. precedenti in cui il principio attivo è veicolato per l'immunizzazione mucosale (nasale, orale, vaginale o rettale).

30. Vaccino secondo le riv. precedenti in cui il principio attivo è somministrato per via sistemica o locale.

31. Vaccino secondo la riv. 30 in cui il principio attivo è somministrato per via intramuscolare, sottocute, intradermica.

32. Vaccino secondo le riv. 29-31 in cui il principio attivo è veicolato in siero autologo.

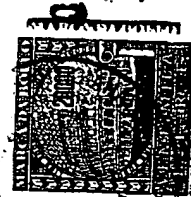
33. Sequenza nucleotidica di Tat (Seq. 1):

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG 3'

34. Sequenza aminoacidica di Tat:

NH2-EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAISY

M 02.03.00



GRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

35. Proteina mutante di Tat avente la sequenza nucleotidica scelta fra:

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante RGD Δ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGDΔ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

36. Sequenza amminoacidica di mutanti di Tat scelta fra:

Sequenza aminoacidica del mutante cys22

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA
LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza aminoacidica lys41

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza aminoacidica del mutante RGDΔ

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Sequenza aminoacidica del mutante lys41-RGDD

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

37. Mutante di Tat avente una sequenza peptidica scelta fra:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

38. Vettore di espressione comprendente una sequenza di DNA scelta fra quelle indicate nelle riv. 33 e 35 o parti di esse.

39. Vettore di espressione pCV0 comprendente una sequenza di DNA scelta fra quelle indicate nelle riv. 33 e 35 o parti di esse.

40. Vettore di espressione pCV0 comprendente cDNA scelto fra quelli dei geni tat, rev, nef, gag, IL-12, IL-15 e relative combinazioni.

41. Cellula trasformata comprendente il vettore secondo le riv. 38-40.

42. Cellule dendritiche inoculate con Tat o suoi peptidi o mutanti o combinazioni con Rev, Nef e Gag e/o citochine.

43. Cellule dendritiche trasdotte con vettori di espressione contenenti il gene tat.

44. Processo per la produzione della proteina Tat o di suoi mutanti o di sue forme ricombinanti o parti di esse consistente nel coltivare la cellula secondo la riv. 41 e nell'isolare la proteina o una sua parte così prodotta.

45. Processo per la preparazione del vettore pCV0 comprendente un cDNA secondo la riv. 40 consistente nell'amplificare detto cDNA mediante tecnica PCR utilizzando primers scelti fra:

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTTCAG3'

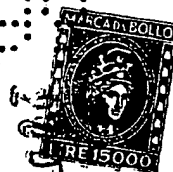
Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTTGAAA3'

Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA



GGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'

46. Primer scelto fra:

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3'

Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'.

47. Processo per preparare un vaccino secondo le riv. precedenti in cui il principio attivo, in forma liofila, viene risospeso in siero autologo per la somministrazione.

48. Impiego di proteina Tat wild-type nella sua forma attiva e/o suoi mutanti e/o relative porzioni di proteina o peptidi o il DNA codificante per dette proteine o dette porzioni o peptidi per realizzare un vaccino

proteico o peptidico o a DNA, profilattico e/o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori, le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV.

49. Impiego di adiuvanti Alum, ISCOM, RIBI da soli o in combinazione per realizzare un vaccino secondo la riv. 1.

50. Impiego di biglie paramagnetiche supportanti gli anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 per realizzare un vaccino secondo la riv. 1."

Postilla 74: Nel testo, ovunque si trovi la numerazione di tipo anglosassone **sostituirla** con la numerazione di tipo italiano.

Postilla 75: Sostituire le Figure con le Tavole da 1 a 16.

Roma, 20 OTT. 1998

Il Mandatario



Dr.ssa MARIA VITTORIA PRIMICERI
della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

1354PTIT

Tavola 1 di 16

H 02.03.99

Massimo Vittoni
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

%Acetil. 0.3 76

TAT

+

+

TAT22

+

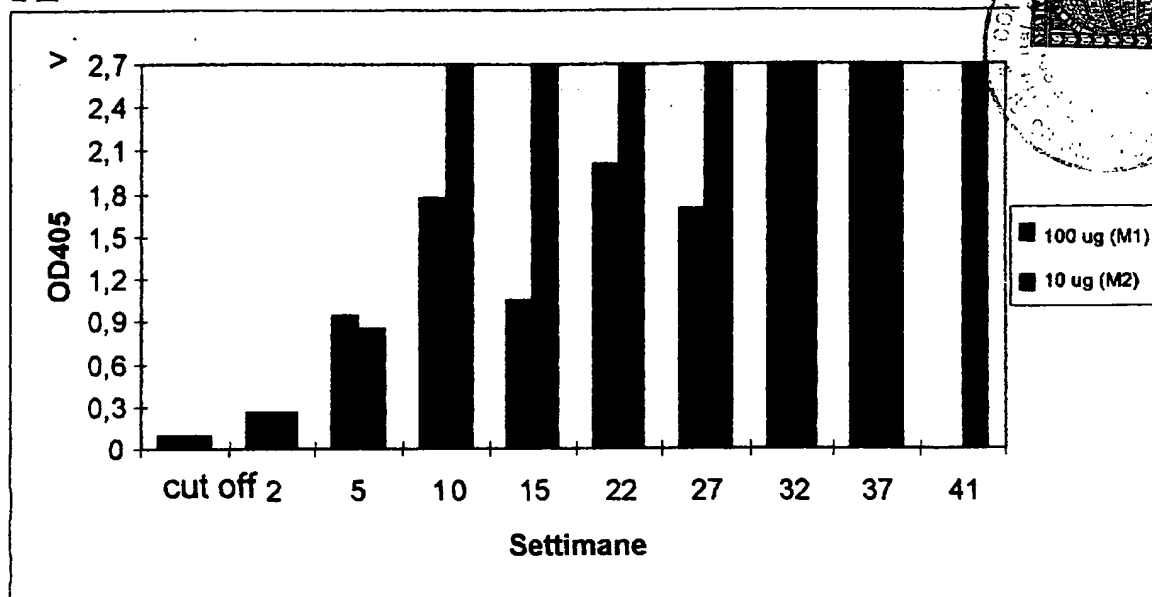
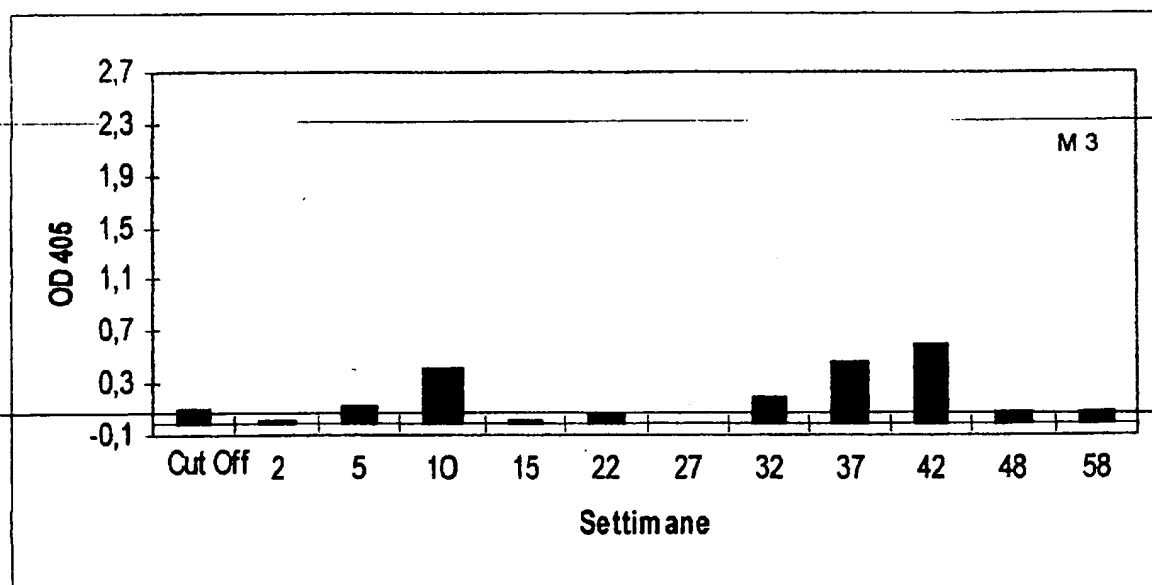
A**B**

Fig. 2

Tavola 3 di 16

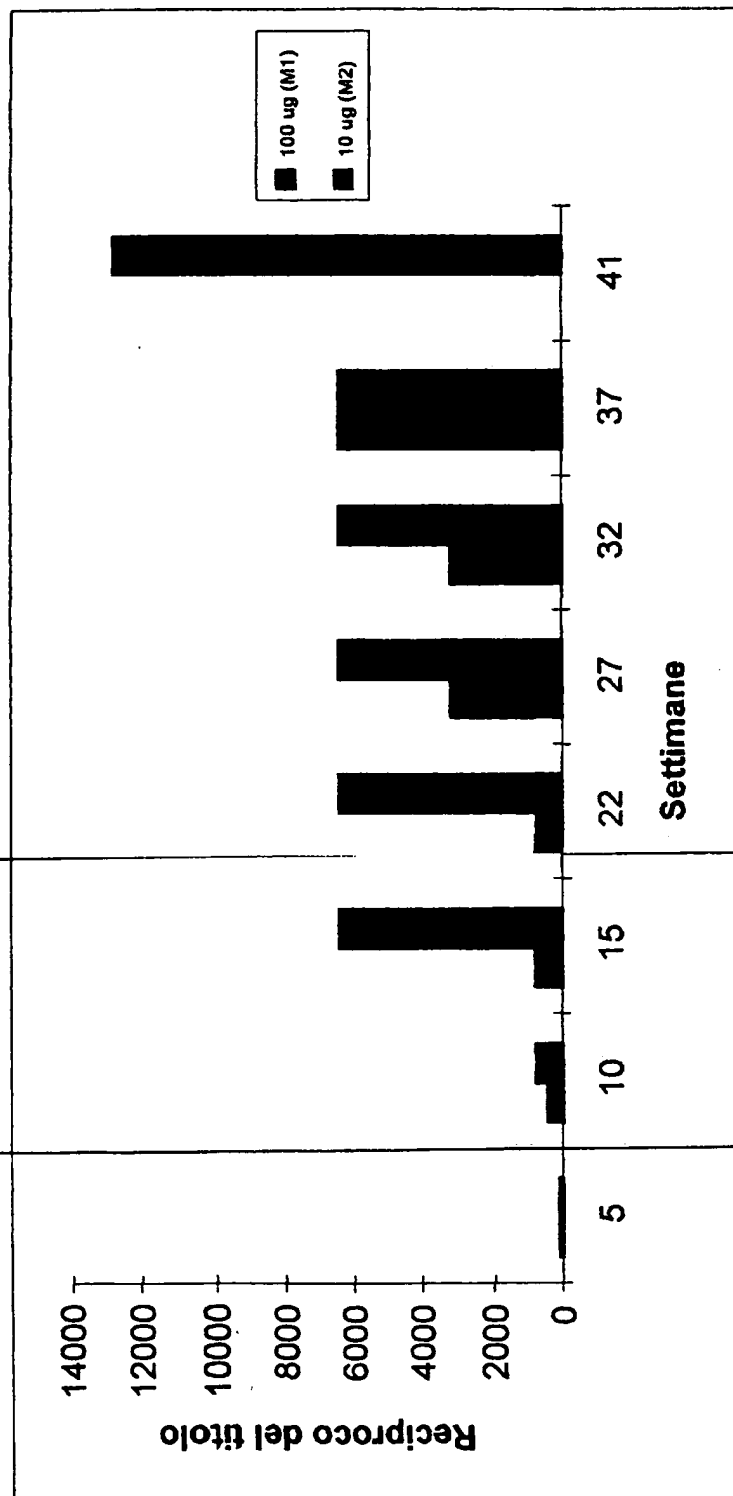


Fig. 3

Tavola 4 di 16

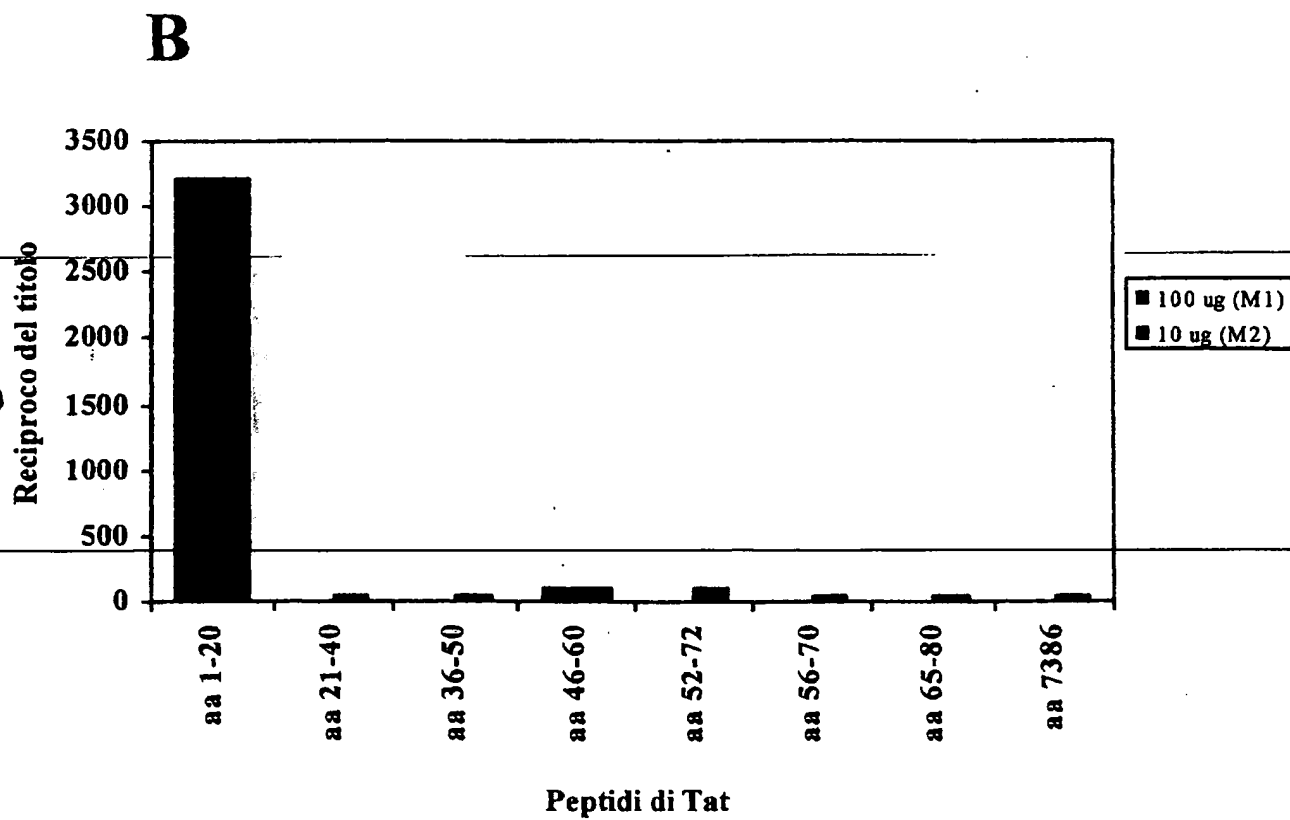
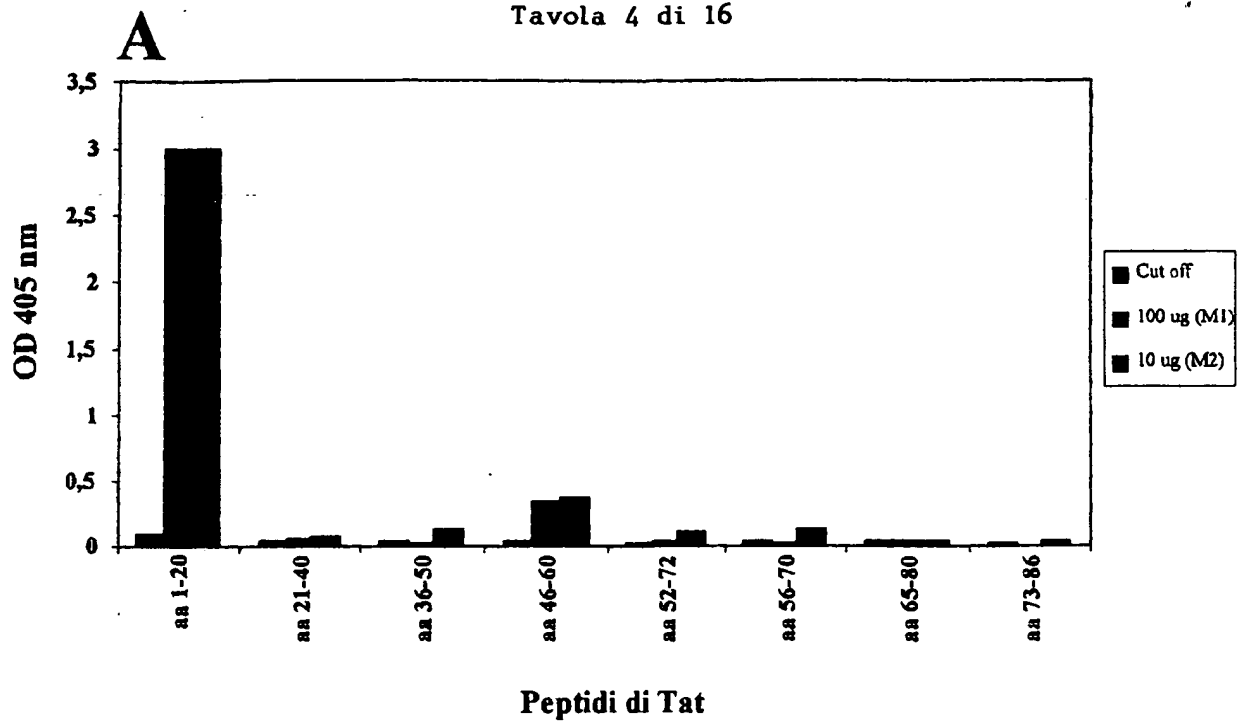


Fig. 4

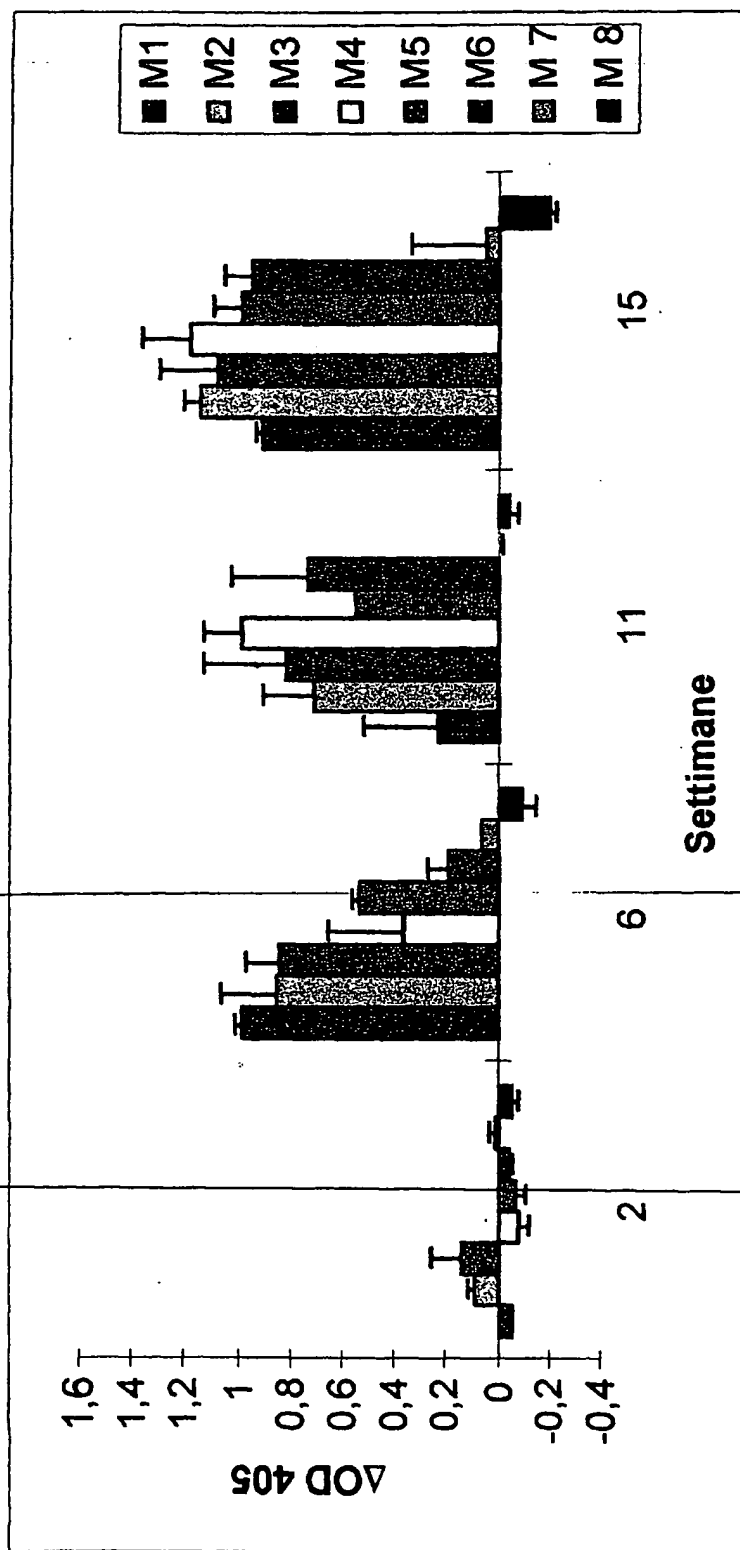


Fig. 5

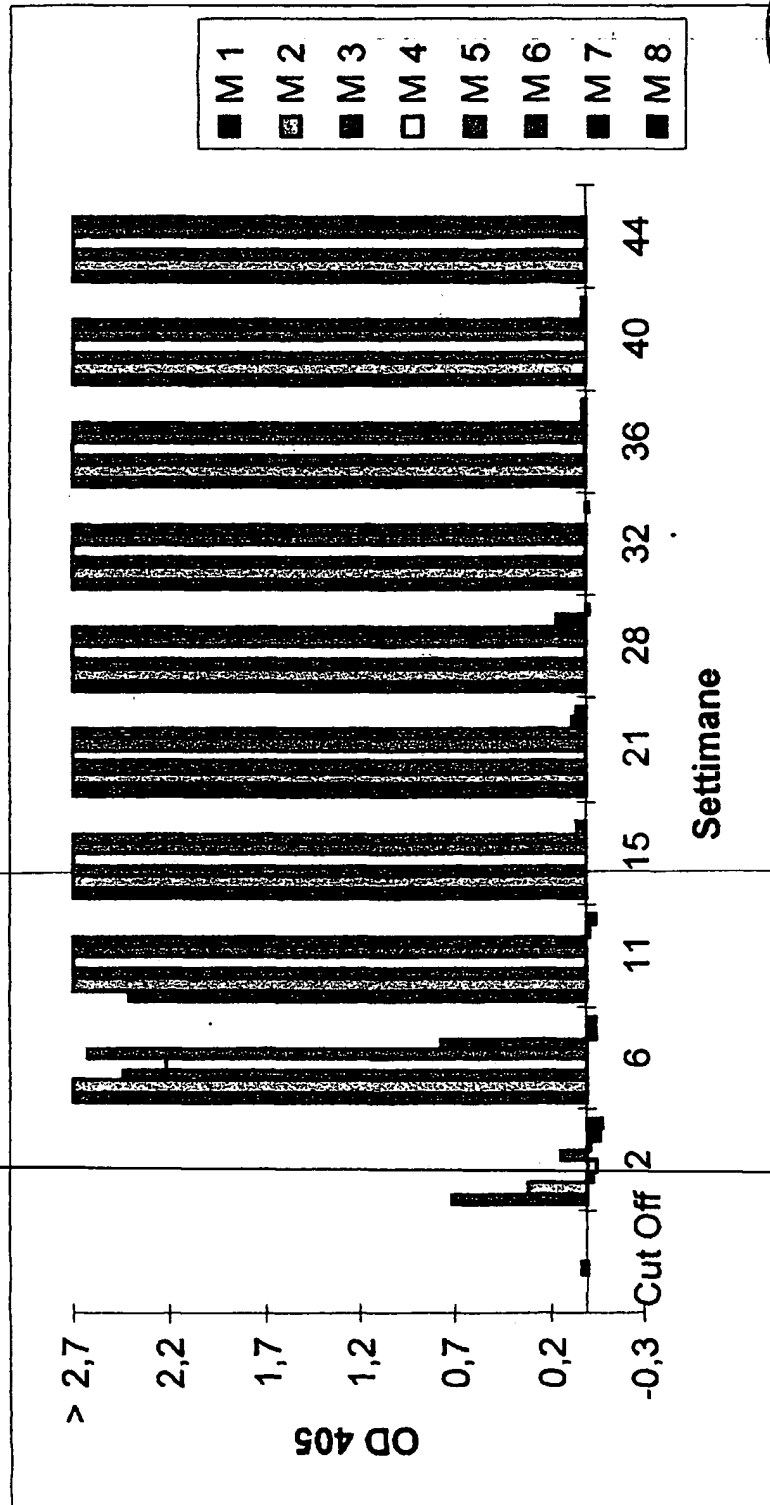


Fig. 6

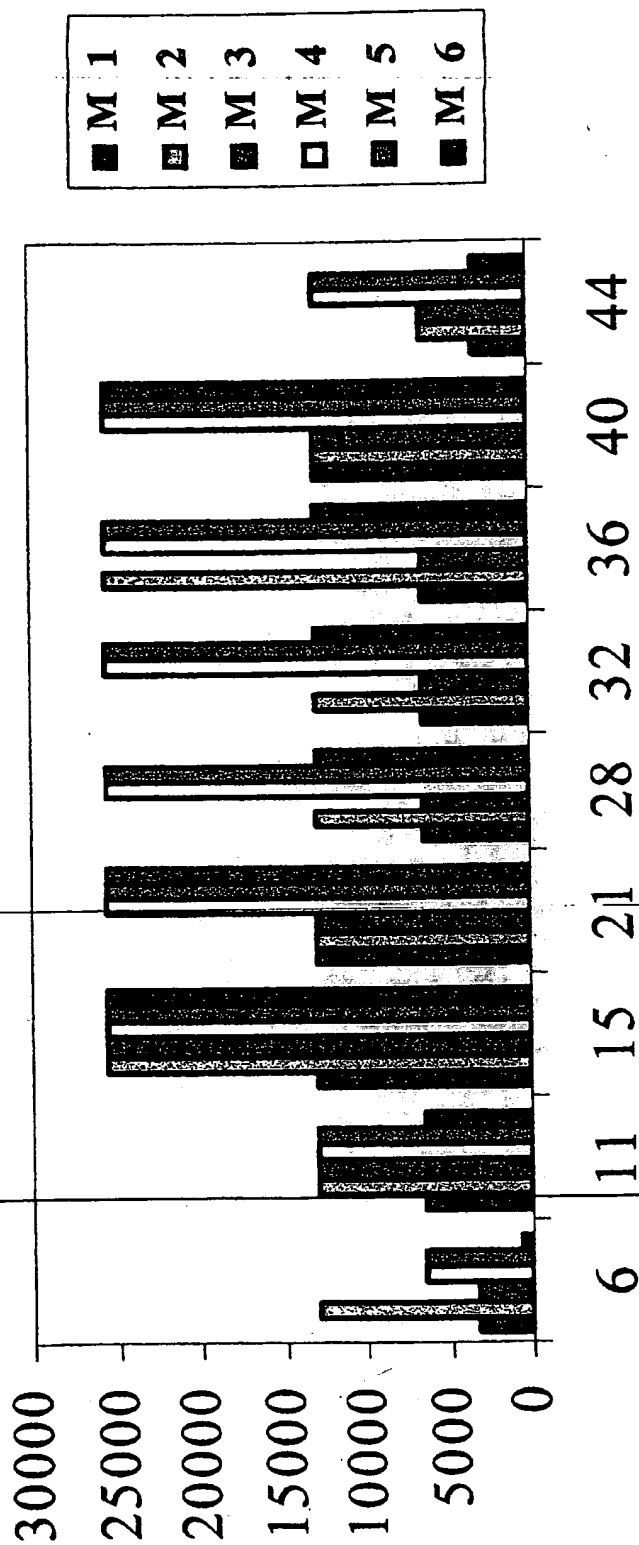


Fig. 7

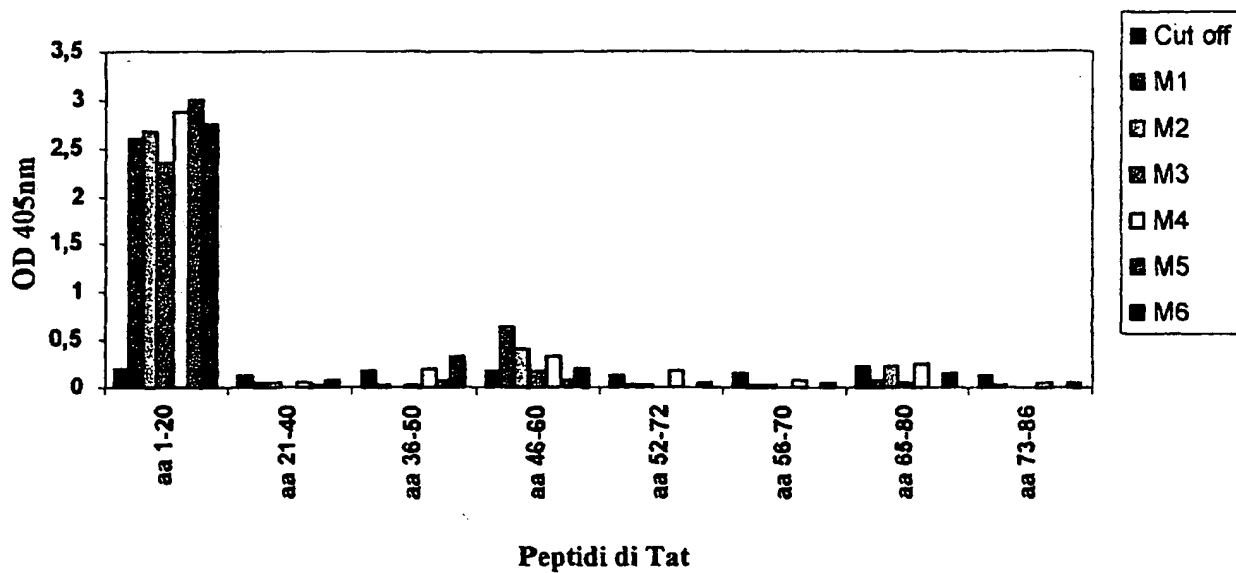
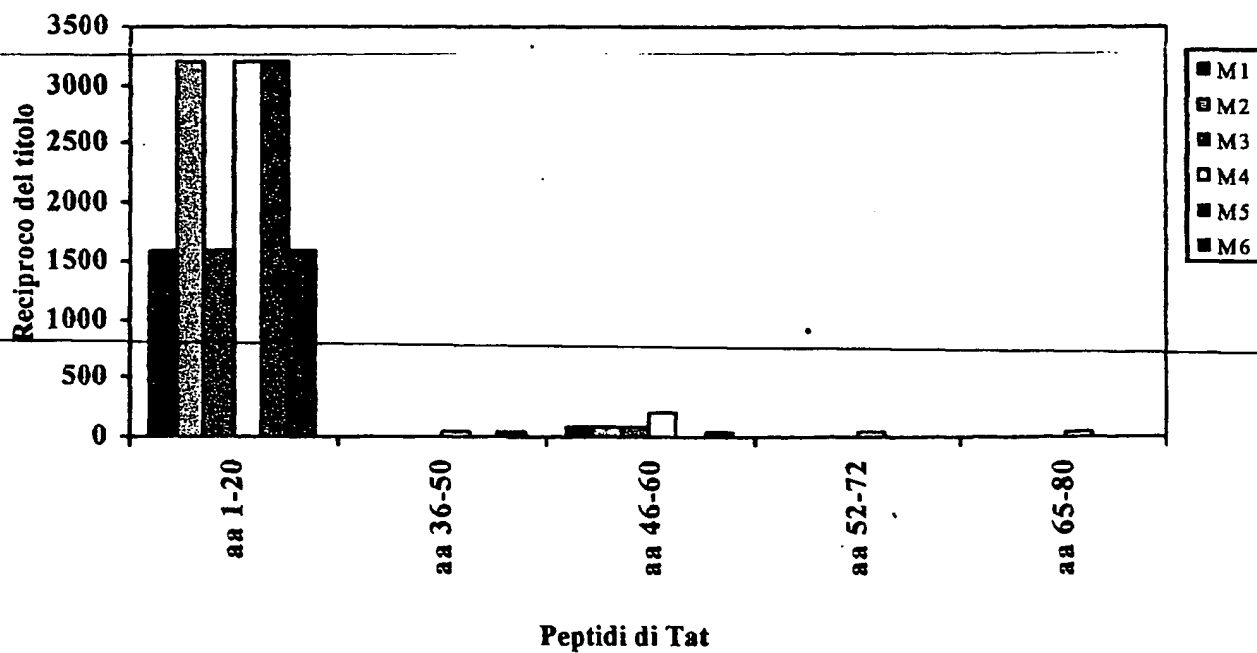
A**B**

Fig. 8

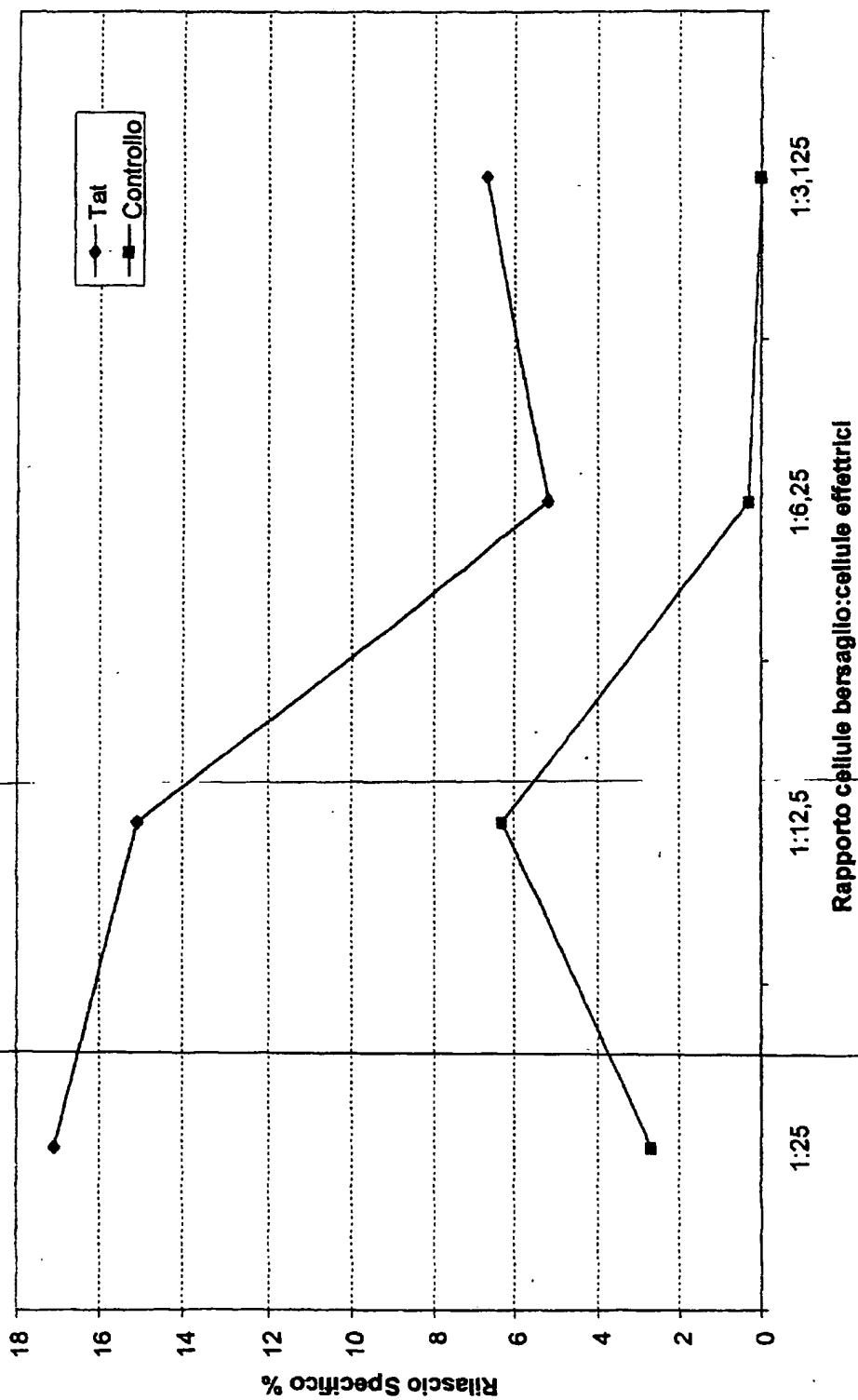


Fig. 9

1354PTIT

Tavola 10 di 16

H. O. V. G. S. P. A.
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

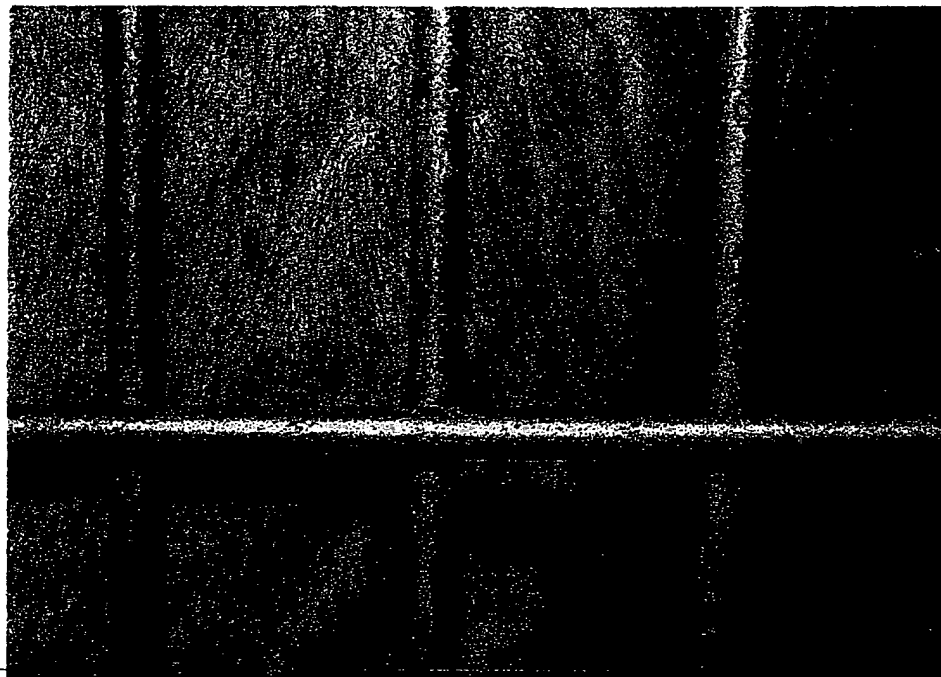


Fig. 10

1354PTIT

Tavola 11 di 16

NOTARE ARTOLO & GERVASI S.p.A.

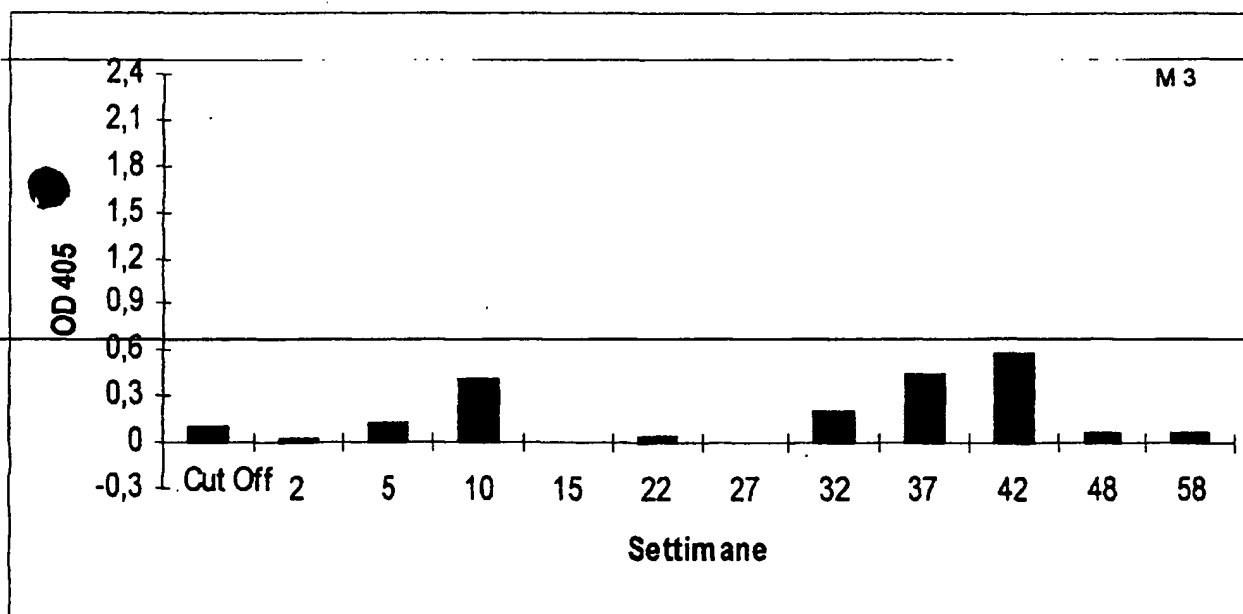
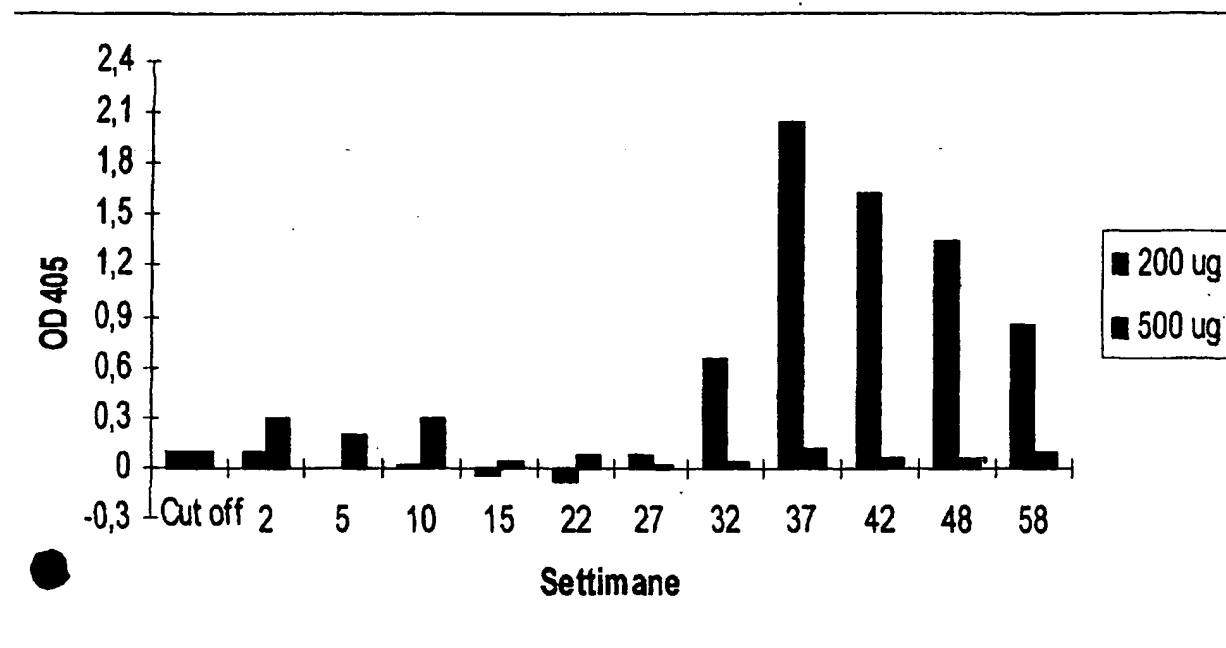


Fig. 11

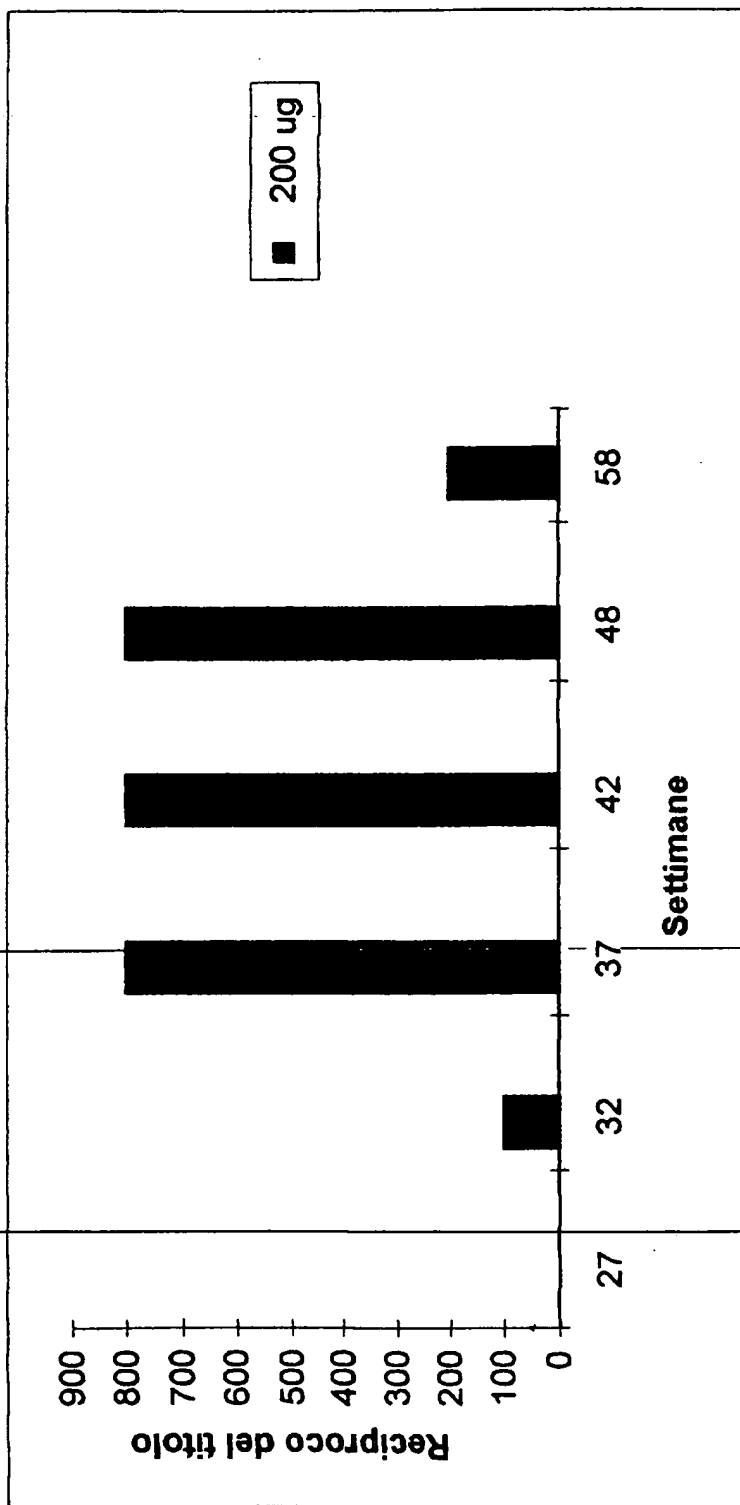


Fig. 12

H O O O *Alvaro Notaro*

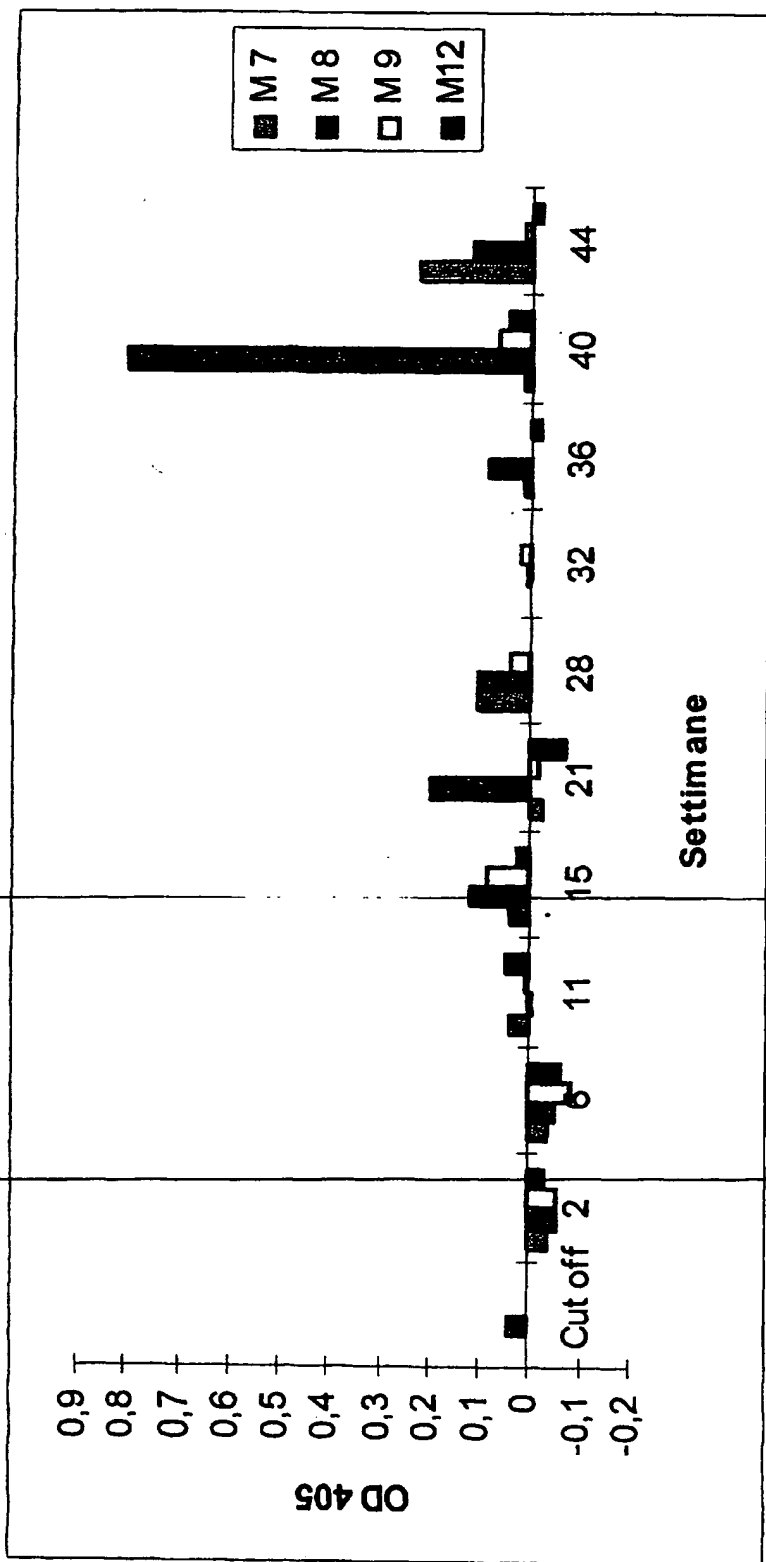


Fig. 13

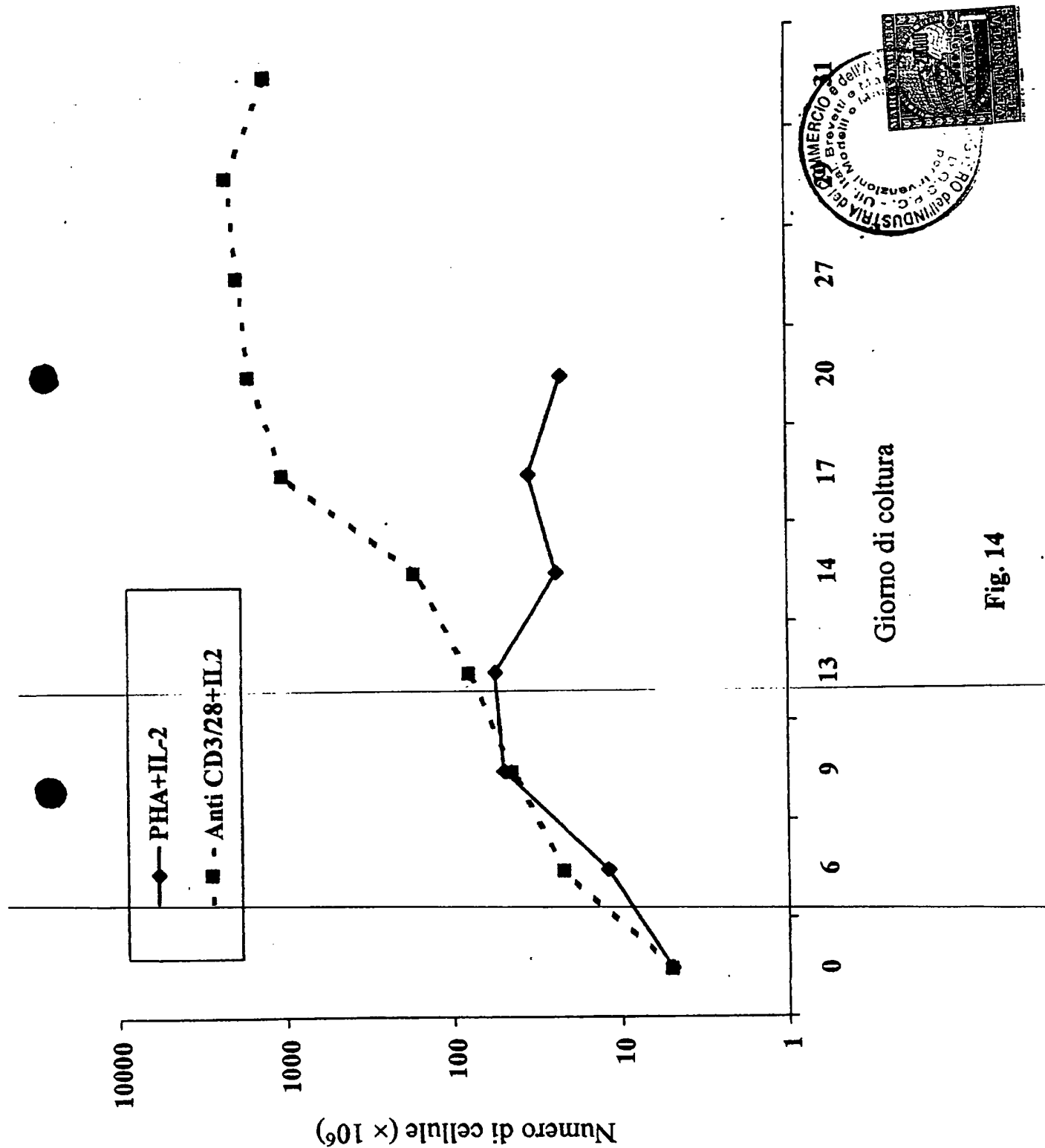
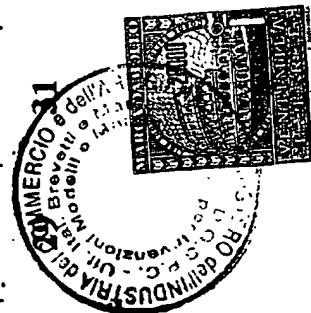
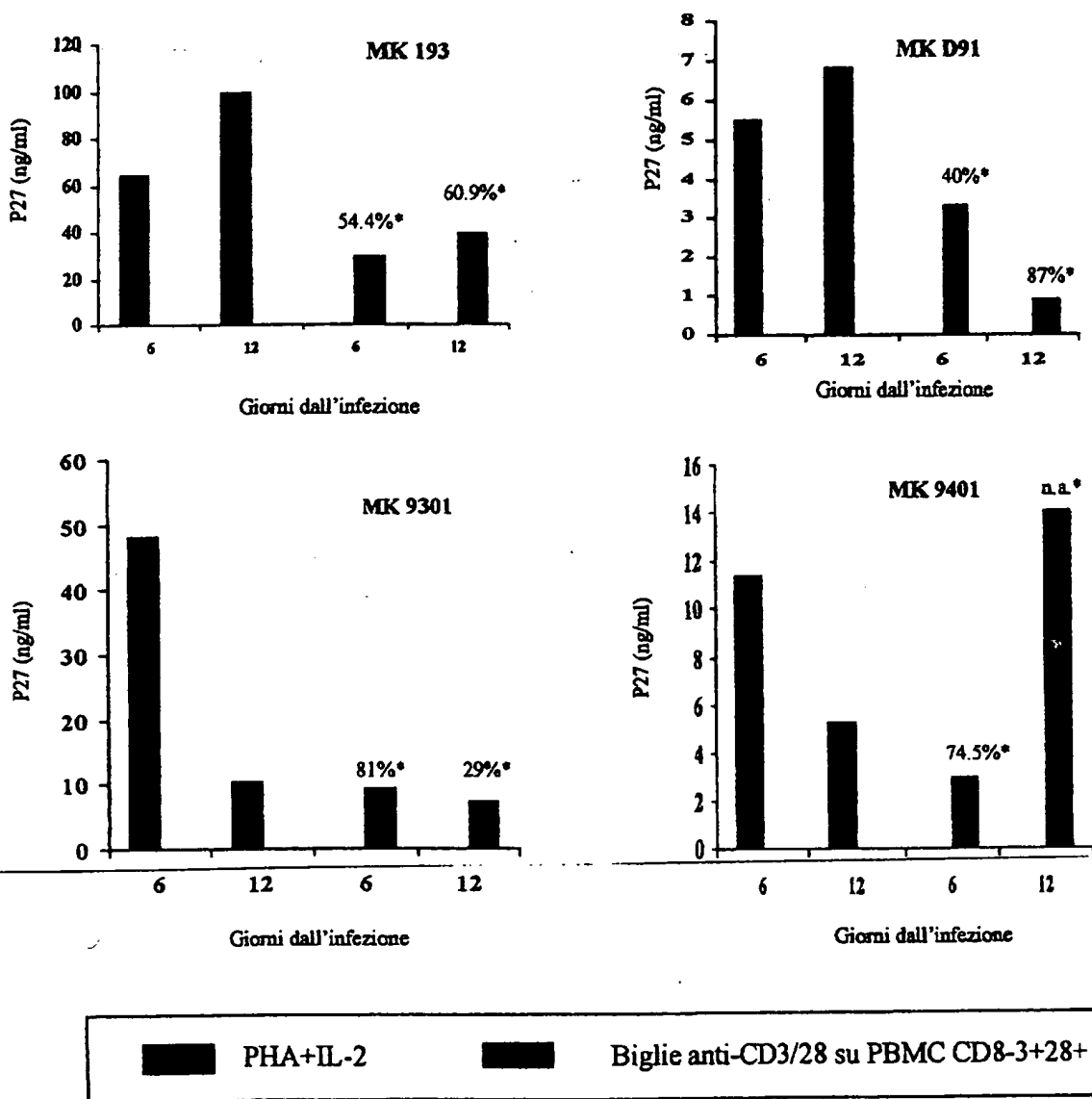


Fig. 14



1354PT1T

Tavola 15 di 16



*: Percentuale di inibizione.

Fig. 15

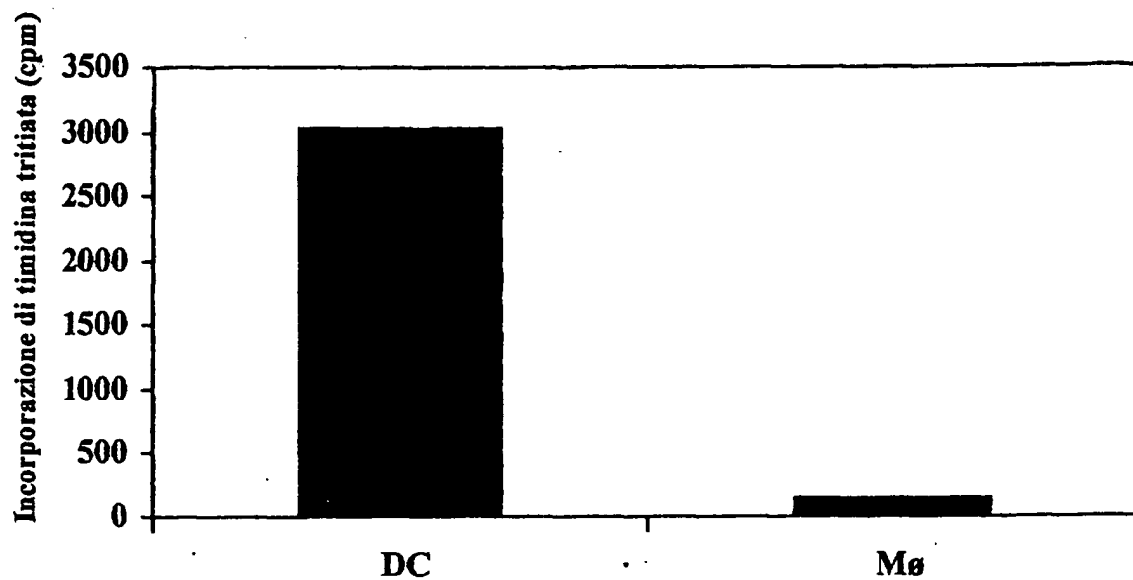
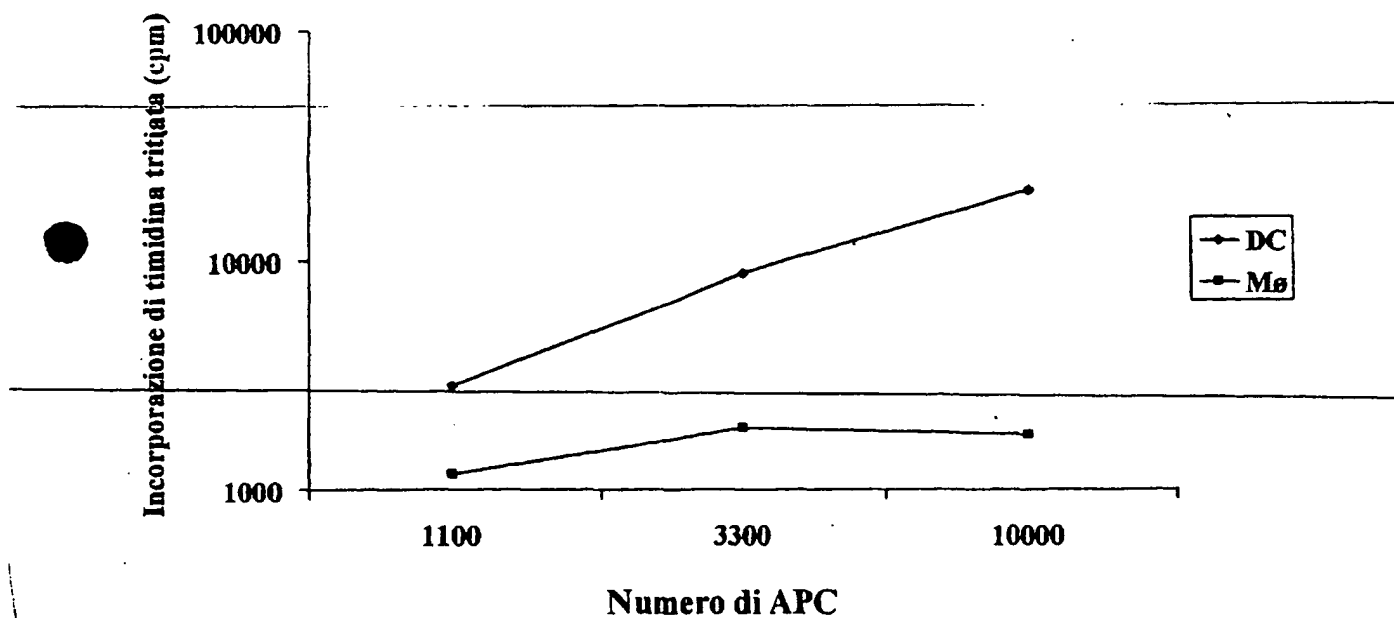
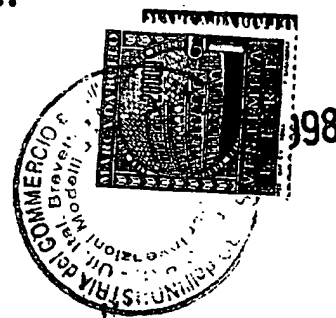
A**B**

Fig. 16

H 02.03.99



MINISTERO DELL'INDUSTRIA COMMERCIO ED ARTIGIANATO

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

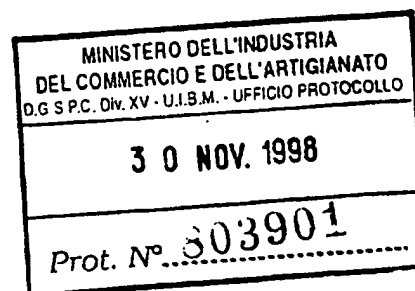
ISTANZA DI CORREZIONE FORMALE

Oggetto: Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale n. RM97A000743 depositata il 01.12.1997 a nome Istituto Superiore di Sanità dal titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli o in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate."

In base all'Art. 49 del DPR 22.06.79 n. 338 il sottoscritto Istituto Superiore di Sanità di nazionalità italiana con sede in Roma Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma, a mezzo mandatarî Dr.ssa Gemma Gervasi (n. 238), Dr. Diego Pallini (n. 484), Dr. Giorgio Moretti (n. 206), Dr. Angelo Passini (n. 73), Ing. Giorgio Coggi (n. 148), Dr. Livio Brighenti (n. 475), Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri (n. 465), Dr.ssa R.C. Asensio (n. 504), Dr. G. Mariani (n. 329) (disgiuntamente) della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A., Via Savoia, 82 - Roma, presso cui elegge domicilio a tutti gli effetti

di legge,

CHIEDE



che Codesto Spettabile Ufficio provveda ad apportare le seguenti correzioni come dalle seguenti postille che abbiamo riportato sul testo precedentemente integrato con nostra istanza di correzione e integrazione del 20.10.1998 protocollo n. 803745:

Postilla 1:

Pag.	Riga
26	18
29	6
30	13
31	4,21
51	18,19,20,21
55	6,7,12, e ultima riga
56	1,10
59	4
63	6
64	16
68	6,7,9,10,11
70	2,4,5,6,7,8
71	dopo Tabella 12 righe: 2,3,4,5,6,7
76	2
77	dopo Tabella 16 righe: 1,5,6,7,8,9,10
81	2
82	15
85	2
87	21
90	dopo Tabella 20 righe: 2,3,4 e penultima e ultima riga
91	dopo Tabella 22 righe: 2,3
92	penultima riga
93	dopo Tabella 24 righe: 1,6
94	9,21
95	dopo Tabella 25 righe: 1,2
97	2,3,17
98	penultima riga
103	dopo Tabella 32 riga 1
119	4

H 02.03.99

trasformare il termine "mg" in " μ g" ed il termine "ml" in " μ l".

Postilla 2: Pagina 103, riga 23: **sostituire** "IFNa,IFNb" con "IFN α ,IFN β "

Postilla 3: Pagina 137, riga 23 e a Pagina 138, riga 5: **sostituire** "RGDD" con "RGD Δ ".

Postilla 4: Pagina 44, riga 1 **sostituire** "CaOH" con "COOH".

Roma, 30.11.1998

Il Mandatario



Dr.ssa MARIA VITTORIA PRIMICERI

della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.